



**PROGRAMA DE DOCTORADO EN
BIOCIENCIAS MOLECULARES**

Estudio de la función y localización de la proteína no estructural VP5 del virus de la bursitis infecciosa

Tesis doctoral realizada por:

Fernando Méndez Hernández

Madrid, 2018



FACULTAD DE
CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Estudio de la función y localización de la proteína no estructural VP5 del virus de la bursitis infecciosa



Tesis doctoral realizada por:

Fernando Méndez Hernández, licenciado en Biología, para optar al grado de
Doctor en Biociencias Moleculares;

dirigida por:

Dr. José Francisco Rodríguez Aguirre,
en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC)

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral ha sido financiada por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, mediante una beca FPI 2012 (BES-2012-052193) enmarcada dentro del proyecto AGL2011-24758. A su vez, su realización ha implicado el esfuerzo de otras muchas personas a parte del mío propio, a las cuales me gustaría agradecer de corazón todo su apoyo y dedicación.

Para empezar, quisiera nombrar a Marta, la persona que hace que me levante y me acueste cada día siendo la persona más feliz del mundo. Desde que te conocí, me siento completo. Te quiero. Además, me gustaría agradecer a su madre, a su padre y a su tía Seli por haberla convertido en la grandísima persona que es hoy en día. Por supuesto, también me gustaría nombrar a toda mi familia, a mis padres José Manual y Piedad, a mis hermanos Pablo y Miguel, a mis tíos Ángel y Maite, a mis primos Carlos y Gonzalo, a Marta, a Laia y al futuro Arnau; por haberme criado y educado en el ambiente perfecto y por hacerme sentir afortunado de formar parte de la mejor familia del mundo con diferencia. Gracias por ser como sois, por haberme convertido en la persona que soy actualmente, y por haberme hecho sentir tan querido siempre.

Cambiando de ámbito, me gustaría agradecer el apoyo, trabajo y ayuda constantes que he recibido por parte de todos los servicios del CNB durante todos los años que me ha llevado la realización de esta tesis doctoral. Muchas gracias a todo el personal de Administración, Servicios Generales, Limpieza, Cocinas, Instrumentación y Mantenimiento. Sin su esfuerzo y dedicación, ni esta ni ninguna otra tesis podría salir adelante. Más en concreto, me gustaría dar las gracias a Silvia y su Servicio de Microscopia Óptica Avanzada, y a Cristina y su Servicio de Microscopía Electrónica; por su inestimable ayuda para obtener los resultados fundamentales que componen esta tesis doctoral. Sin la colaboración de estas dos grandes profesionales, mi tesis no existiría.

Como no, quisiera agradecer el apoyo y amistad que me han brindado todas las personas con las que he compartido mi tiempo en el CNB durante todos estos años. Por supuesto, a todos mis compañeros y amigos del laboratorio 117 con los que he tenido el gran honor de coincidir (Dani Luque, Laura Delgui, Nerea, Idoia, Romy, Gemma, Tomás, Nico, Dani, Alex, Luis, Laura...), con los cuales he compartido infinidad de gratas aventuras y desventuras durante todos estos años. Su compañía diaria, su amistad, sus risas y el buen rollo que en todo momento ha habido en el laboratorio será algo que siempre llevaré conmigo. También a los chicos/as del laboratorio 113 de Lolo y las chicas de Thrombotargets (Esther, María y Merche). Muchas gracias por toda vuestra ayuda, y apoyo constantes a nivel científico, y por vuestra compañía y amistad a nivel personal.

A su vez, me gustaría dar las gracias especialmente a Antonio, por todo lo que me ha enseñado durante estos años, y por su apoyo y ayuda constantes en todo lo que hiciera falta. Sin él, nuestro laboratorio no sería ni una décima parte de lo que es hoy en día.

Por otro lado, también querría agradecer especialmente la ayuda de Lili, Tomás y Nico en la elaboración de esta tesis doctoral. Sin su colaboración y trabajo, algunos de los experimentos que componen esta tesis nunca podrían haberse realizado. El éxito de esta tesis, en gran medida, también es suyo. Muchísimas gracias a los tres.

También me gustaría pararme un momento a dar las gracias a Diego Ferrero. Nunca he compartido laboratorio con alguien más inteligente y entregado a la ciencia que él. Quisiera darle las gracias por todo lo que me enseñó y por haberme permitido disfrutar de su compañía durante varios años. Los buenos tiempos que compartí con él en el laboratorio siempre los recordaré como los mejores de todos estos años. Aunque las difíciles circunstancias nos han separado, siempre le seguiré considerando como un gran amigo.

Para continuar, me gustaría dejar patente mi gratitud hacia Lolo y Juanra. Qué decir de Lolo... sus conocimientos, apoyo y ayuda constantes durante todos estos años han sido (y seguirán siendo) de incalculable valor. Por otro lado, siempre le estaré agradecido a Juanra por haber confiado en mí laboralmente hablando, en mi etapa postdoctoral. Espero estar a la altura de las expectativas, y no defraudarle nunca.

En el ámbito laboral, también me gustaría recalcar mi gratitud hacia Eli. Es imposible tener una mejor compañera de trabajo que ella. Profesional, inteligente, trabajadora, agradable y buena persona. No se puede pedir más.

Y por supuesto, para terminar me gustaría recalcar mi eterno agradecimiento a Ana y Paco, mis “padres” en esto de la ciencia. Desde que llegué al CNB, Ana me recibió con los brazos abiertos y me enseñó absolutamente todo lo necesario para poder ser alguien en un laboratorio. Sus conocimientos, bondad e increíble paciencia hicieron de ella la mentora ideal. Y a partir de ese momento, su amistad y ayuda siempre han estado disponibles para lo que hiciera falta. Gracias infinitas por ser como eres. En el caso de Paco, cualquier cosa que pudiera decir sobre él se quedaría corta. Todo lo que he logrado a nivel científico y laboral ha sido gracias a él. Se lo debo todo. Sin la confianza que en su momento depositó en mí, y que aún perdura, no sería la persona que soy hoy en día, ni a nivel profesional y científico, ni sobre todo, a nivel personal. No es un jefe, es un amigo. No es un amigo, es mucho más que eso, es un referente en todos los sentidos.

RESUMEN

El virus de la bursitis infecciosa (IBDV), perteneciente a la familia *Birnaviridae*, es un importante patógeno aviar responsable de una enfermedad inmunosupresora que afecta a pollos de gallina doméstica. Las partículas de IBDV son icosaedros desnudos que encapsidan un genoma bipartito formado por RNA bicatenario. Este trabajo se ha centrado en el estudio de la proteína VP5 de IBDV, un polipéptido no estructural dispensable para la replicación de IBDV que juega un papel central en la patogenia provocada por el virus. A pesar de su importancia, al comienzo del presente trabajo la caracterización molecular y funcional de esta proteína era muy pobre.

Nuestros estudios han permitido establecer que VP5 se expresa durante todo el ciclo de replicación de IBDV, siguiendo un patrón temporal similar al del resto de proteínas virales. Por otra parte, nuestros resultados demuestran que la proteína VP5 no está implicada en procesos elementales del ciclo de replicación, tales como la replicación/transcripción del genoma, la traducción de proteínas virales o el ensamblaje de la progenie viral. Los datos experimentales obtenidos indican que esta proteína tiene una importancia crítica sobre la capacidad de diseminación del virus. A lo largo de este trabajo se ha determinado que IBDV emplea dos mecanismos para la liberación de la progenie viral. Un mecanismo de liberación no lítico, no descrito anteriormente, dependiente de la expresión de la proteína VP5, que permite la salida de una fracción substancial de la progenie viral durante la fase exponencial del ciclo replicación sin afectar a la viabilidad celular; y un segundo mecanismo de liberación tardío, directamente asociado a la destrucción de la integridad celular. El mecanismo de liberación no lítica incrementa de forma significativa la capacidad de diseminación del virus.

Además, en el presente estudio nosotros hemos determinado las bases moleculares del tropismo membranal de la proteína, mostrando que su acumulación en la membrana celular se produce mediante interacciones electrostáticas entre el dominio policationico localizado en el extremo C-terminal de la proteína y lípidos aniónicos presentes en la cara citosólica de la membrana plasmática. Mediante ensayos de interacción *in vitro* empleando matrices lipídicas y diferentes versiones de la proteína purificadas mediante cromatografía de afinidad, se ha determinado que VP5 interacciona de forma específica con diferentes fosfoinosítidos (PIP), preferencialmente con derivados monofosfato de fosfatidilinositol. Finalmente, se ha determinado que la delección de su dominio de interacción con PIPs reduce significativamente la capacidad de diseminación del virus y la producción de virus extracelular.

ABSTRACT

The infectious bursal virus (IBDV), belonging to the *Birnaviridae* family, is an important avian pathogen responsible for an immunosuppressive disease that affects domestic chicken. The IBDV particles are naked icosahedra harboring a bipartite genome formed by double-stranded RNA. This work has focused on the study of the VP5 protein of IBDV, a non-structural polypeptide dispensable for the replication of IBDV that plays a central role in the pathogenesis caused by the virus. Despite its importance, at the beginning of this study the molecular and functional characterization of this polypeptide were very poor as yet.

Our studies have established that VP5 is expressed throughout the cycle of IBDV replication, following a temporal pattern similar to that of other viral proteins. On the other hand, our results show that the VP5 protein is not involved in elementary processes of the replication cycle, such as genome replication/transcription, translation of viral proteins or the assembly of the virus progeny. The experimental data described here indicate that this protein has a critical importance on virus dissemination. Throughout this work, it has been determined that IBDV employs two mechanisms for the release of viral progeny. A previously undescribed non-lytic release mechanism, dependent upon the expression of the VP5 protein, which allows the exit of a substantial fraction of the viral progeny during the exponential phase of the replication cycle without affecting cell viability; and a late release mechanism directly associated with the destruction of cell integrity. The non-lytic release mechanism significantly enhances virus spreading.

In addition, in the present study we have determined the molecular bases underlying the membrane tropism of the protein, showing that its accumulation at the cell membrane is the result of electrostatic interactions between the polycationic domain located at the C-terminal end of the protein and anionic lipids present in the cytosolic face of the plasma membrane. In vitro interaction assays using lipid matrices and different versions of the protein purified by affinity chromatography, have shown that VP5 specifically interacts with different phosphoinositides (PIP), preferably with phosphatidylinositol monophosphate derivatives. Finally, it has been determined that the deletion of the VP5-PIP interaction domain significantly reduces virus dissemination and extracellular virus yields.

ÍNDICE

Resumen / Abstract	4
Índice	6
Clave de abreviaturas	9
Compendio de figuras	12
INTRODUCCIÓN	14
1. El virus de la bursitis infecciosa	15
1.1. Generalidades y taxonomía de IBDV	15
1.2. Tropismo y proceso de infección natural de IBDV	16
1.3. Serología y patogénesis de IBDV	17
1.4. Persistencia y evolución reciente de IBDV	18
1.5. Genoma y programa de expresión génica de IBDV	19
1.6. Estructura del virión de IBDV	21
1.7. Ciclo de replicación de IBDV	22
2. La proteína no estructural VP5	24
2.1. Generalidades sobre la proteína VP5 de IBDV	24
2.2. Papel de la proteína VP5 durante la replicación de IBDV	26
2.3. Análisis de secuencia de la proteína VP5 de IBDV	26
3. Estructura y función de los fosfoinosítidos	28
OBJETIVOS	32
MATERIALES Y MÉTODOS	34
1. Células, virus, infecciones y transfecciones	35
2. Generación de VACV recombinantes	36
3. Generación de virus IBDV mutantes	37
4. Ensayo de placa para IBDV	38
5. Generación de plásmidos	39
6. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes VP5 marcadas con el epítipo FLAG a partir de cultivos bacterianos	40
7. Generación del anticuerpo policlonal anti-VP5 en conejo	40

8. Análisis por PCR cuantitativa (qPCR)	41
9. SDS-PAGE, <i>Western blotting</i> y autoradiografía	42
10. Ensayo cuantitativo de muerte celular en tiempo real	43
11. Análisis de inmunofluorescencia mediante microscopia confocal	43
12. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	44
13. Ensayos de unión a lípidos	45
14. Análisis estadístico	46
RESULTADOS	47
1. Caracterización del papel de la expresión de la proteína VP5 en el ciclo replicativo viral	48
1.1. Análisis del patrón de expresión temporal de la proteína VP5 en células infectadas por IBDV	48
1.2. Determinación del papel funcional de VP5 en el proceso de transcripción/replicación de IBDV	49
1.3. Determinación del papel de VP5 en el proceso de traducción de proteínas de IBDV	51
1.4. Determinación del papel de VP5 en el proceso de ensamblaje de la progenie de IBDV	52
1.5. Determinación del papel de VP5 en la cinética de muerte celular provocada por la infección por IBDV	54
1.6. Determinación del papel de VP5 sobre el tamaño de la progenie infectiva de IBDV	57
1.7. Determinación del papel de VP5 en la diseminación de IBDV	59
1.8. Determinación del papel de VP5 en la capacidad de diseminación de IBDV al nivel de célula individual	60
1.9. Determinación del papel de VP5 en la ultraestructura de células infectadas por IBDV	64
2. Caracterización del mecanismo de interacción de la proteína VP5 con la membrana plasmática (PM)	69
2.1. Implicación del dominio policatiónico del extremo C-terminal de la proteína VP5 en su localización subcelular	69
2.2. Determinación del papel de la carga electropositiva del dominio policatiónico del extremo C-terminal de la proteína VP5 en su tropismo membranal	73

2.3. Interacción de la proteína VP5 con fosfoinosítidos a través de su región policatiónica	75
2.4. Determinación del papel funcional del dominio de unión a PIPs de la proteína VP5 en la infección por IBDV	78
2.5. Determinación del papel del dominio de unión a PIPs de la proteína VP5 sobre la capacidad de diseminación célula a célula de IBDV y en la producción de virus extracelular	80
DISCUSIÓN	83
1. Regulación temporal de la expresión y contribución de la proteína VP5 durante el ciclo de replicación viral	84
2. Liberación no lítica de IBDV	85
3. Bases moleculares del tropismo membranal de la proteína VP5	89
4. Interacción entre la proteína VP5 y PIPs	90
CONCLUSIONES	93
BIBLIOGRAFÍA	95

CLAVE DE ABREVIATURAS

- **BSA**: Albúmina de suero bovino (“Bovine serum albumin” por sus siglas en ingles).
- **BSC40**: Células en cultivo cuyo origen son células epiteliales de riñón de mono verde africano.
- **CLSM**: Microscopia confocal de escaneo laser (“Confocal laser scanning microscopy” por sus siglas en ingles).
- **DF-1**: Células en cultivo cuyo origen son fibroblastos embrionales de pollo espontáneamente transformados.
- **DMEM**: Medio Eagle modificado por Dulbecco (“Dulbecco's modified Eagle medium” por sus siglas en ingles).
- **DNA**: Ácido desoxirribonucleico (“Deoxyribonucleic acid” por sus siglas en ingles).
 - Variantes: **cDNA**: DNA complementario (“Complementary” por sus siglas en ingles).
- **E. coli**: Bacteria de la especie *Escherichia coli*.
- **ER**: Retículo endoplasmático (“Endoplasmic reticulum” por sus siglas en ingles).
- **FCS**: Suero fetal de ternera (“Fetal calf serum” por sus siglas en ingles).
- **FLAG**: Epítipo proteico formado por el péptido DYKDDDDK.
- **FVP5**: Proteína VP5 que tiene fusionado en su extremo N-terminal el epítipo FLAG.
- **GFP**: Proteína verde fluorescente (“Green fluorescent protein” por sus siglas en ingles).
- **HeLa**: Células en cultivo cuyo origen son células epiteliales de cáncer cervical humano.
- **IBD**: Enfermedad de la bursitis infecciosa, o enfermedad de Gumboro (“Infectious bursal disease” por sus siglas en ingles).
- **IBDV**: Virus de la bursitis infecciosa (“Infectious bursal disease virus” por sus siglas en ingles).
 - Patotipos: · **(M)**: Virulencia leve (“Mild” por sus siglas en ingles).
 - **(I)**: Virulencia intermedia (“Intermediate” por sus siglas en ingles).
 - **(CV)**: Virulencia clásica (“Classical virulent” por sus siglas en ingles).
 - **(VV)**: Muy virulentas (“Very virulent” por sus siglas en ingles).
- **IFN**: Interferón (“Interferon” por sus siglas en ingles).
- **IPTG**: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido.
- **kb**: Kilobase (1.000 pares de bases nitrogenadas).
- **kDa**: KiloDalton (1.000 Daltons o unidades de masa atómica unificada).
- **mAb**: Anticuerpos monoclonales (“Monoclonal antibodies” por sus siglas en ingles).
- **MDa**: MegaDalton (1.000.000 Daltons o unidades de masa atómica unificada).
- **Mock**: Control experimental negativo, en el que la muestra no ha sido infectada por ningún virus.

- **MOI**: Multiplicidad de infección (“Multiplicity of infection” por sus siglas en ingles).
- **MVB**: Cuerpos multivesiculares (“Multivesicular bodies” por sus siglas en ingles).
- **MW**: Peso molecular (“Molecular weight” por sus siglas en ingles).
- **NMR**: Resonancia magnética nuclear (“Nuclear magnetic resonance” por sus siglas en ingles).
- **PBS**: Tampón fosfato salino (“Phosphate buffered saline” por sus siglas en ingles).
- **PCR**: Reacción de la polimerasa en cadena (“Polymerase chain reaction” por sus siglas en ingles).
- **PFU**: Unidad formadora de placa (“Plaque-forming unit” por sus siglas en ingles).
- **p.i.**: Post infección (“Post-infection” por sus siglas en ingles).
- **PI**: Fosfatidilinositol (“Phosphatidylinositol” por sus siglas en ingles).
- **PI3K**: Fosfatidilinositol 3-quinasa (“Phosphatidylinositol 3-kinase” por sus siglas en ingles).
- **PIP**: Fosfoinosítido (“Phosphatidylinositol phosphate” por sus siglas en ingles).
- **PM**: Membrana plasmática (“Plasmatic membrane” por sus siglas en ingles).
- **PTM**: Modificación postraduccional (“Post-translational modification” por sus siglas en ingles).
- **PVA**: Matriz paracristalina de virus (“Paracrystalline virus array” por sus siglas en ingles).
- **ORF**: Marco de lectura abierto (“Open reading frame” por sus siglas en ingles).
- **QM7**: Células en cultivo cuyo origen son mioblastos musculares de codorniz.
- **qPCR**: PCR cuantitativa (“Quantitative PCR” por sus siglas en ingles).
- **RACK1**: Receptor 1 de la quinasa C activada (“Receptor for activated C-kinase 1” por sus siglas en ingles).
- **RdRp**: RNA polimerasa dependiente de RNA.
- **RIN**: Numero de integridad del RNA (“RNA integrity number” por sus siglas en ingles).
- **RNA**: Ácido ribonucleico (“Ribonucleic acid” por sus siglas en ingles).
 - Variantes: **dsRNA**: RNA de doble cadena (“Double-stranded” por sus siglas en ingles).
 - mRNA**: RNA mensajero (“Messenger” por sus siglas en ingles).
 - ssRNA**: RNA de cadena simple (“Single-stranded” por sus siglas en ingles).
- **RNP**: Ribonucleoproteína (“Ribonucleoprotein” por sus siglas en ingles).
- **RT**: Temperatura ambiente (“Room temperature” por sus siglas en ingles).
- **Soroa**: Cepa de IBDV de virulencia clásica (CV) adaptada a crecer en cultivos celulares, considerada como WT.
- **SPF**: Libres de patógenos específicos (“Specific pathogen free” por sus siglas en ingles).
- **SDS-PAGE**: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (“Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis” por sus siglas en ingles).

- **TEM:** Microscopia electrónica de transmisión (“Transmission electron microscopy” por sus siglas en ingles).
- **TLR:** Receptor de tipo Toll (“Toll-like receptor” por sus siglas en ingles).
- **UTR:** Región no traducida (“Untranslated region” por sus siglas en ingles).
- **VACV:** Virus vacunal (“Vaccinia virus” por sus siglas en ingles).
- **VCV:** Vesícula que contiene viriones (“Vesicle-containing virions” por sus siglas en ingles).
- **VDCA2:** Canal selectivo de aniones dependiente de voltaje 2 (“Voltage-dependent anion-selective channel protein 2” por sus siglas en ingles).
- **VPg:** Proteína viral unida al genoma (“Viral protein genome-linked” por sus siglas en ingles).
- **WT:** Tipo salvaje (“Wild type” por sus siglas en ingles).

COMPENDIO DE FIGURAS

- Figura 1. Sistema linfóide del pollo.	17
- Figura 2. Genoma y programa de expresión génica de IBDV.	20
- Figura 3. Estructura de IBDV.	22
- Figura 4. Modelo propuesto de liberación de los complejos RNP de IBDV.	23
- Figura 5. Localización subcelular de la proteína VP5 de IBDV.	25
- Figura 6. Secuencia primaria de la proteína VP5 de la cepa Soroa.	27
- Figura 7. Alineamiento múltiple de secuencia correspondiente a los 23 aminoácidos C-terminales de la proteína VP5 codificada por el genoma de varias cepas de IBDV pertenecientes a diferentes patotipos.	28
- Figura 8. Representación de la estructura química del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PI(4,5)P ₂).	29
- Figura 9. Distribución subcelular de los lípidos presentes en la cara citosólica de distintas membranas celulares.	30
- Figura 10. Análisis de la expresión temporal de la proteína VP5 en células infectadas por IBDV.	48
- Figura 11. Efecto de la eliminación de la proteína VP5 sobre la acumulación de RNA total.	49
- Figura 12. Efecto de la expresión de la proteína VP5 sobre el proceso de transcripción/replicación del genoma de IBDV.	50
- Figura 13. Efecto de la expresión de la proteína VP5 sobre el proceso de síntesis de proteínas virales.	52
- Figura 14. Efecto de la expresión de la proteína VP5 sobre el ensamblaje de IBDV.	53
- Figura 15. Identificación de viriones de IBDV mediante inmuno-microscopía electrónica.	54
- Figura 16. Efecto de la expresión de la proteína VP5 sobre la inducción de muerte celular.	56
- Figura 17. Efecto de la expresión de la proteína VP5 sobre el rendimiento de progenie viral durante un único ciclo infeccioso por IBDV.	57
- Figura 18. Efecto de la expresión de la proteína VP5 en el rendimiento de progenie viral durante varias rondas de replicación viral.	59
- Figura 19. Efecto de la expresión de la proteína VP5 sobre el tamaño de placa de lisis de IBDV.	60

- Figura 20. Efecto de la expresión de la proteína VP5 en la diseminación de IBDV al nivel de célula independiente.	61
- Figura 21. Visualización de la liberación de IBDV al nivel de célula individual.	63
- Figura 22. Efecto de la expresión de la proteína VP5 en el ultraestructura de células infectadas por IBDV.	65
- Figura 23. Galería de VCVs localizados en células infectadas por IBDV.	66
- Figura 24. Viriones de IBDV aparentemente liberados a partir de células infectadas.	67
- Figura 25. Proceso no lítico de liberación activa de partículas infectivas de IBDV a partir de células infectadas.	68
- Figura 26. Restos celulares provenientes de la lisis de células infectadas por IBDV.	69
- Figura 27. Papel del dominio C-terminal de VP5 en la localización subcelular de la proteína GFP.	71
- Figura 28. Efecto de la delección del extremo C-terminal de VP5 sobre la localización subcelular de la proteína.	72
- Figura 29. Contribución de la carga neta electropositiva del extremo C-terminal de la proteína VP5 en su localización subcelular.	74
- Figura 30. Purificación de la proteína FVP5 expresada en <i>E. coli</i> .	76
- Figura 31. Contribución del extremo C-terminal en la interacción de la proteína VP5 con PIPs.	77
- Figura 32. Efecto de la delección del dominio de unión a PIPs en la localización subcelular de la proteína VP5 en células infectadas por IBDV.	79
- Figura 33. Efecto de la delección del dominio de unión a PIPs de la proteína VP5 sobre el tamaño de placa de lisis y en la producción de virus extracelular.	82

Introducción

1. EL VIRUS DE LA BURSITIS INFECCIOSA

1.1. Generalidades y taxonomía de IBDV

El virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), único representante del género *Avibirnavirus* de la familia *Birnaviridae* (Delmas et al., 2012), es el virus mejor caracterizado de esta familia compuesta por cuatro géneros: i) *Aquabirnavirus*, que infectan a peces, moluscos y crustáceos; ii) *Avibirnavirus*, que infectan a aves; iii) *Blosnavirus*, que infectan a peces de la especie cabeza de serpiente (*Channa maculata*); y iv) *Entomobirnavirus*, que infectan a insectos. De acuerdo a la clasificación de Baltimore (Baltimore, 1971), los birnavirus pertenecen al grupo III, virus con genoma de doble cadena de RNA (dsRNA).

IBDV es el agente causal de una enfermedad inmunosupresora, aguda y altamente contagiosa conocida como enfermedad de la bursitis infecciosa (IBD), también denominada enfermedad de Gumboro, atendiendo al lugar donde se detectó el primer brote de la enfermedad (Gumboro, Delaware, EE.UU., 1957) (Cosgrove, 1962). Aunque aún se desconoce su reservorio/s natural, la IBD afecta a aves de corral, especialmente formas juveniles de pollos de gallina (*Gallus gallus*) y pavos (*Meleagris gallopavo*) domésticos. Además de representar un peligro potencial para especies de aves silvestres (Gardner et al., 1997), la importancia fundamental del estudio de este virus radica en su relevancia económica. La IBD causa año tras año enormes pérdidas a la industria avícola mundial, hecho que condujo a su inclusión en la lista de “enfermedades de declaración obligatoria para animales terrestres y acuáticos” de la Organización Mundial de Sanidad Animal (<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2016/>).

De acuerdo a datos recientes, más del 60% de la producción mundial de pollos de engorde se encuentra sometida a estrictos programas para la prevención de brotes de esta enfermedad. Estos programas incluyen la vacunación tanto de las madres con virus inactivados como la de los propios pollos de engorde con vacunas vivas (Müller et al., 2012). Sin embargo, la implementación de estos programas no ha conseguido evitar la diseminación de la enfermedad, que actualmente afecta a la práctica totalidad del planeta. Desde los aislamientos iniciales, se ha observado un incremento significativo en la virulencia de las cepas virales circulantes (Berg, 2000). Este incremento agrava de forma significativa las pérdidas económicas de la industria avícola, un sector vital para la industria agroalimentaria mundial. De acuerdo con Eurostat, las aves de corral constituyen la segunda, y más barata, fuente de proteína animal para los ciudadanos europeos. En el conjunto de los 28 países que conforman la Unión Europea, se estima que en el año 2016 se

produjeron aproximadamente 13,8 millones de toneladas de productos derivados de aves de corral, con un consumo estimado de 22,6 kg *per capita*. Además, la tendencia del mercado es continuar con un crecimiento moderado pero constante en los próximos años (http://ec.europa.eu/agriculture/markets-and-prices/medium-term-outlook/index_en.htm).

La relevancia de estos datos viene refrendada por el hecho de que las aves de corral proporcionan más del 30% del total de proteínas consumidas en los países en vías del desarrollo, siendo así la principal fuente de proteína animal en estas áreas (<http://www.fao.org/docrep/005/y4252e/y4252e00.htm>). De esta manera, las consecuencias de los brotes de IBDV en gran parte de Sudamérica, África y Asia constituyen un importante factor limitante para la vital producción de aves de corral de estas regiones. Como ejemplo del impacto de IBDV en estos países, recientes muestreos serológicos en Nigeria y Tanzania muestran que aproximadamente el 60% de la población de pollos criados en explotaciones familiares, una fuente de alimento fundamental en estos países, son seropositivos para IBDV (Swai et al., 2011, Sule et al., 2013).

1.2. Tropismo y proceso de infección natural de IBDV

La principal diana de IBDV son las células precursoras de linfocitos B (células productoras de anticuerpos) localizadas en la bursa o bolsa de Fabricio (Becht, 1980), un órgano linfoide, próximo a la cloaca, esencial para la maduración del sistema inmune aviar (Figura 1). Los pollos en fase de crecimiento (entre las 3 y las 6 semanas de vida) que aún presentan un sistema inmune inmaduro, son los individuos más susceptibles y afectados por IBDV (Kibenge et al., 1988).

El consenso establecido actualmente indica que la infección natural ocurre por transmisión horizontal indirecta, iniciándose a través de la ruta oral-fecal. Tras la ingestión de material (habitualmente fecal) que contiene virus infectivo, las partículas virales son fagocitadas por los macrófagos residentes en el intestino, los cuales transportan el virus a otros tejidos. Tras alcanzar la bolsa de Fabricio, el virus replica activamente en pre-linfocitos B portadores de inmunoglobulinas de tipo M (IgM) (Rodenberg et al., 1994). La infección causa una rápida y severa disminución de la población de linfocitos B bursales, siendo a su vez afectados otros órganos linfoides secundarios, tales como el bazo, el timo y las amígdalas cecales (Ingrao et al., 2013) (Figura 1). Esta importante disminución de la población linfocitaria provoca un cuadro de inmunosupresión que dificulta la maduración inmunológica de las aves infectadas, afecta la respuesta a los programas de vacunación e incrementa de forma drástica la susceptibilidad a patógenos oportunistas. Estos datos han sido confirmados por experimentos recientes que

demuestran la capacidad de IBDV para infectar y replicar en macrófagos, pero no el linfocitos T (Aricibasi et al., 2010).

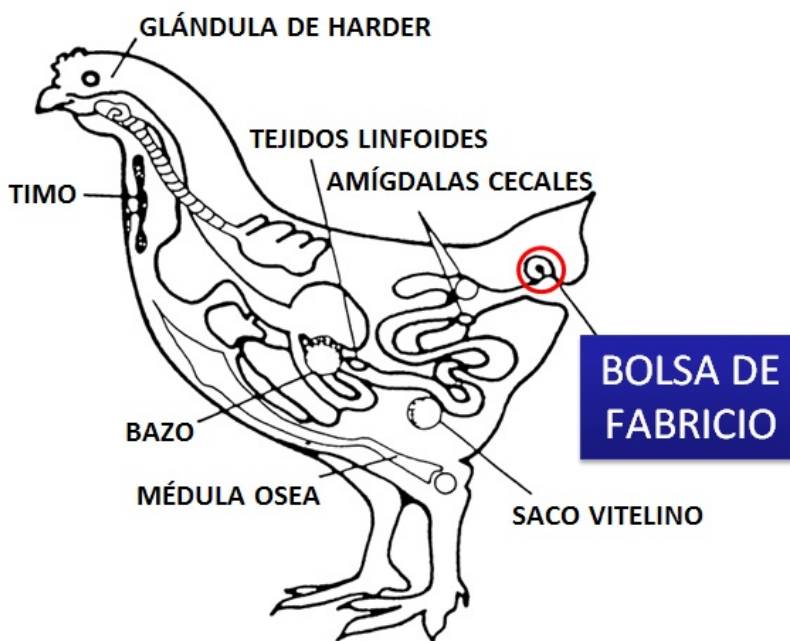


Figura 1. Sistema linfático del pollo. En el esquema se representan los principales órganos linfoides del pollo.

1.3. Serología y patogénesis de IBDV

Se han identificado dos serotipos bien diferenciados de IBDV. El serotipo I agrupa a todas las cepas que muestran propiedades patogénicas en pollos domésticos, mientras que las cepas del serotipo II, principalmente aisladas en pavos asintomáticos, no son patogénicas en pollos de gallina doméstica libres de patógenos específicos (SPF). Las cepas del serotipo I se agrupan en cuatro patotipos muy amplios: i) virulencia leve (M); ii) virulencia intermedia (I), iii) virulencia clásica (CV) y iv) muy virulentas (VV). Las cepas M e I, aisladas a partir de los brotes iniciales de IBD (finales de la década de 1950), causan una atrofia bursal reversible y sus tasas de mortalidad son insignificantes. Por otro lado, las cepas CV, aisladas durante la década de 1960, inducen lesiones hemorrágicas, reducción del tamaño de los folículos de la bolsa de Fabricio y tasas de mortalidad entre el 30 y el 60%, siendo su morbilidad del 100%. Por último, las cepas VV, surgidas con posterioridad a 1990 y actualmente prevalentes en Europa, Asia, África y Latino América, inducen síntomas clínicos similares, aunque exacerbados, a los provocados por las cepas CV y mortalidades de entre el 70 y el 90% en pollos SPF (van den Berg et al., 2000). El incremento en la virulencia parece estar asociado a la aparición de mutaciones puntuales en la región hipervariable de la proteína VP2 de la cápsida viral (Bayliss et al., 1990). Esta región, comprendida entre los

aminoácidos 206-350 de la proteína, es responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes durante la infección (Fahey et al., 1989). Algunas mutaciones en esta región dieron lugar a la aparición de nuevas cepas virales capaces de escapar a la acción de los anticuerpos neutralizantes inducidos por las vacunas clásicas producidas a partir de cepas M e I de IBDV (Giambrone and Closser, 1990, Vakharia et al., 1994).

1.4. Persistencia y evolución reciente de IBDV

La detección de cepas IBDV correspondientes al serotipo I en gallinas ponedoras asintomáticas (Maw et al., 2008) sugiere la capacidad del virus para establecer infecciones persistentes *in vivo* (Jeon et al., 2008). Estas observaciones han sido confirmadas recientemente en pollos SPF infectados de manera experimental (Abdul et al., 2013). Estos estudios sugieren que una elevada proporción de los individuos que sobreviven a la fase aguda de la infección se mantienen persistentemente infectados. Aunque estas aves no presentan síntomas clínicos, los análisis histopatológicos muestran la presencia de folículos bursales inusualmente pequeños e infiltrados con macrófagos, linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, así como linfocitos B presentadores de antígeno activados (Rauf et al., 2013). En línea con estas observaciones, nuestro grupo de investigación ha demostrado la capacidad de IBDV para infectar persistentemente linfoblastos bursales DT40 (Delgui et al., 2009a), así como diferentes líneas celulares de origen aviar y humano.

Uno de los aspectos más intrigantes en la historia natural y evolución reciente de IBDV está relacionado con el drástico cambio observado en la patogénesis inducida por el virus a lo largo de un periodo de 60 años, desde los brotes iniciales causados por cepas M, hasta los actuales brotes provocados por cepas VV. Muchos grupos de investigación han centrado su atención y esfuerzos en desentrañar los factores moleculares responsables del incremento de la virulencia de IBDV. A parte de las mutaciones detectadas en la región hipervariable de la proteína VP2, estos estudios muestran que la virulencia en IBDV es un rasgo poligénico y que su aumento está asociado a la existencia de una serie de mutaciones conservadas dispersas en el genoma viral, que afectan a cada una de las proteínas codificadas por el virus (Brown et al., 1994, Boot et al., 2000, Brandt et al., 2001, Wang et al., 2004, Wang et al., 2007, Qi et al., 2009, Qin et al., 2009, Escaffre et al., 2013, Qi et al., 2013, Gao et al., 2014). Por otra parte, el análisis filogenético de cepas VV sugiere que estas mutaciones han evolucionado de manera independiente en ambos segmentos del genoma viral. Junto con estas mutaciones, la rápida diversificación del virus y a la aparición del patotipo VV han sido el resultado de un evento de reordenamiento genómico (*reassortment*) que se estima tuvo lugar durante la década de 1980 (Hon et al., 2006). Este reordenamiento de segmentos

podría haber sido favorecido por la naturaleza heteroploide del virus. Estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que los viriones de IBDV encapsidan de manera aleatoria hasta cuatro segmentos genómicos, siendo las poblaciones virales con mayor número de segmentos genómicos las que presentan una mejor relación entre el número de partículas físicas y el número de partículas infectivas (Luque et al., 2009a).

1.5. Genoma y programa de expresión génica de IBDV

El genoma de IBDV está compuesto por dos segmentos (A y B) de dsRNA que codifican cinco proteínas maduras (denominadas VP) (Dobos et al., 1979). El Segmento A (3,2 kb) contiene dos marcos de lectura abiertos (ORFs) parcialmente solapados (ORF A1 y ORF A2) y su transcripción genera un único mRNA bicistrónico. El ORF A1 codifica la proteína no estructural VP5 [145 aminoácidos; 16,5 kDa; aparenta ≈19 kDa en electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)] que aun jugando un papel fundamental en la virulencia y diseminación del virus, es dispensable para su replicación *in vitro* e *in vivo* (Mundt et al., 1997, Yao et al., 1998, Lombardo et al., 2000). Más adelante se presentara una descripción más detallada acerca del conocimiento actual sobre esta proteína. El ORF A2 codifica una poliproteína de elevado peso molecular (1.012 aminoácidos; 109,7 kDa) que sufre un procesamiento autoproteolítico cotraduccional, catalizado por la proteasa viral VP4, que libera tres proteínas independientes (Birghan et al., 2000, Feldman et al., 2006). La proteína pVP2 (512 aminoácidos; 54,4 kDa; aparenta ≈48 kDa en SDS-PAGE), precursor de la proteína madura de la cápsida VP2 (441 aminoácidos; 47,1 kDa; aparenta ≈41 kDa en SDS-PAGE) que constituye aproximadamente el 50% del contenido proteico del virión; la proteasa viral VP4 (243 aminoácidos; 26,7 kDa); y VP3 (257 aminoácidos; 28,9 kDa; aparenta ≈32 kDa en SDS-PAGE) que constituye el 40% del contenido proteico del virión. La proteína VP3 forma homodímeros que interaccionan con dsRNA así como con las proteínas virales pVP2 (precursor de la proteína VP2) y VP1 que se describe más adelante. La proteína VP3 juega un papel temporal de andamiaje esencial durante el proceso de morfogénesis de la partícula viral, activa a la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) viral VP1 y está implicada en el control de la respuesta innata antiviral de la célula huésped (Tacken et al., 2003, Saugar et al., 2005, Garriga et al., 2007, Casanas et al., 2008, Busnadiego et al., 2012, Valli et al., 2012, Ye et al., 2014) (Figura 2).

La conversión de la proteína inmadura pVP2 a su forma madura, VP2, requiere de varios eventos proteolíticos. Tras escindirse cotraduccionalmente de la proteasa VP4, la región C-terminal de pVP2 es procesada en las posiciones 501, 494 y 487 (enlaces Ala-Ala), sitios diana secundarios de VP4 (Sanchez and Rodriguez, 1999). El intermediario de pVP2 resultante (487 aminoácidos) es procesado por la proteasa PurSA de la célula huésped en la posición 452 (Irigoyen et al., 2012). Finalmente, la proteína sufre un último procesamiento autoproteolítico durante la maduración de la partícula viral, que da lugar a la proteína VP2 madura (441 aminoácidos) (Irigoyen et al., 2009). Este procesamiento proteolítico en cascada del extremo C-terminal de pVP2 genera cuatro péptidos anfipáticos denominados pep7a, pep7b, pep11 y pep46, que permanecen asociados al virión. Estos péptidos parecen jugar un papel relevante en el proceso de desensamblaje de la partícula viral durante el proceso de internalización del virus en la célula huésped (Chevalier et al., 2005).

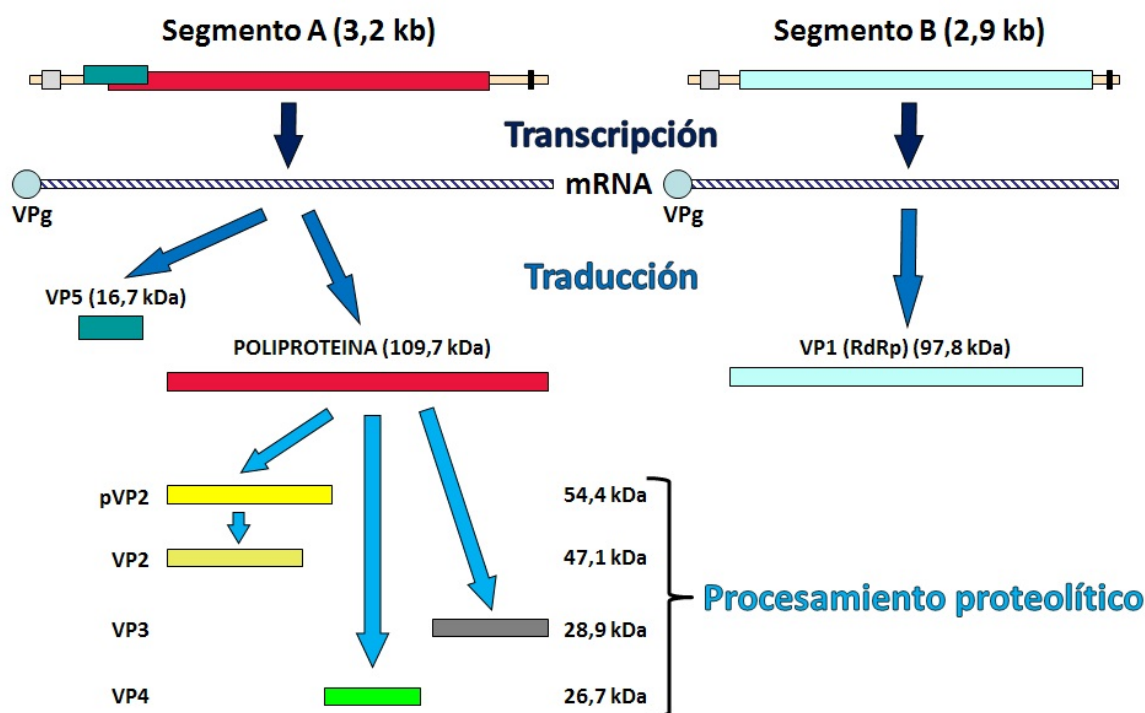


Figura 2. Genoma y programa de expresión génica de IBDV. La transcripción del segmento A de IBDV produce un mRNA bicistrónico responsable de la traducción tanto de la proteína VP5 como de la poliproteína viral. Esta última, sufre una serie de eventos de procesamiento proteolítico en cascada dando lugar a las proteínas maduras VP2, VP3 y VP4. La transcripción del Segmento B da lugar a un único mRNA responsable de la traducción de la proteína VP1 (RdRp).

El Segmento B (2,8 kb) contiene un único ORF (ORF B) que codifica la proteína VP1 (880 aminoácidos; 97,8 kDa), un polipéptido multifuncional responsable de la replicación del genoma y de la síntesis de los mRNAs virales. La proteína VP1 actúa como RdRp (von Einem et al., 2004, Garriga et al., 2007), como cebador durante el proceso de replicación/transcripción del dsRNA

genómico y como proteína viral unida al genoma (VPg), permaneciendo unida covalentemente a los extremos 5' de ambas cadenas de los dsRNA genómicos (Kibenge and Dhama, 1997). La transcripción del genoma del birnavirus sigue un mecanismo semiconservativo que libera la cadena parental codificante (+) del segmento de dsRNA correspondiente (Mertens et al., 1982). El RNA de cadena simple (ssRNA) liberado, que permanece unido a la proteína VPg, es empleado como molde para la replicación del RNA y como mRNA para la síntesis de las proteínas virales. Los mRNAs virales carecen de estructuras cap-5' y de poly(A) en su extremo 3'. Por otra parte, estos mRNAs carecen de sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) de tamaño canónico (>300 nucleótidos). Por tanto, se ha formulado la hipótesis de que la VPg unida al extremo 5' de estos mRNAs podría jugar un papel clave en la iniciación del proceso de traducción (Tacken et al., 2004) (Figura 2). Resultados recientes apoyan esta hipótesis (Ye et al., 2017).

1.6. Estructura del virión de IBDV

Los viriones de IBDV carecen de envuelta lipídica y presentan una única cápsida icosaédrica con un diámetro de entre 65 y 70 nm (≈ 37 MDa) con simetría T=13L. La cápsida está formada por 260 trímeros de la proteína VP2 (Bottcher et al., 1997, Caston et al., 2001) en cuyo interior se aloja el genoma viral (Delmas et al., 2012). La gran mayoría ($\geq 98\%$) de los viriones infectivos contienen un genoma heteroploide formado por cuatro segmentos genómicos incorporados a la cápsida de forma aleatoria (Luque et al., 2009a). En el interior del virión, el dsRNA viral se encuentra en forma de complejos ribonucleoproteicos (RNP), asociado a múltiples copias de la proteína VP3 que lo recubren en toda su longitud y a la proteína VP1, tanto en forma "libre" como en su forma VPg (Luque et al., 2009b) (Figura 3A-C).

La presencia de complejos RNP es un rasgo estructural fundamental que diferencia a los birnavirus de los virus dsRNA prototípicos, como los miembros de la familia *Reoviridae*. El genoma de los reovirus está confinado en el interior de una cápsida viral interna, también conocida como núcleo transcripcional, que aporta la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis y extrusión de mRNAs virales maduros al citoplasma de la célula infectada. Esta estructura, que permanece inalterada durante el ciclo replicativo, protege al dsRNA genómico frente a los sensores de dsRNA celulares, tales como PKR, RIG-I, MDA5 y TLR3, contribuyendo a evitar el desencadenamiento de la respuesta innata antiviral (Lawton et al., 2000). Sin embargo, en birnavirus los complejos RNP actúan como entidades transcripcionales independientes, tanto *in vitro* como durante la infección viral (Luque et al., 2009b, Dalton and Rodriguez, 2014). Diferentes estudios han demostrado que la proteína VP3 sustituye funcionalmente al núcleo transcripcional de reovirus, protegiendo al dsRNA

viral y controlando la activación de las proteínas PKR y MDA5 (Valli et al., 2012, Busnadiago et al., 2012, Ye et al., 2014).

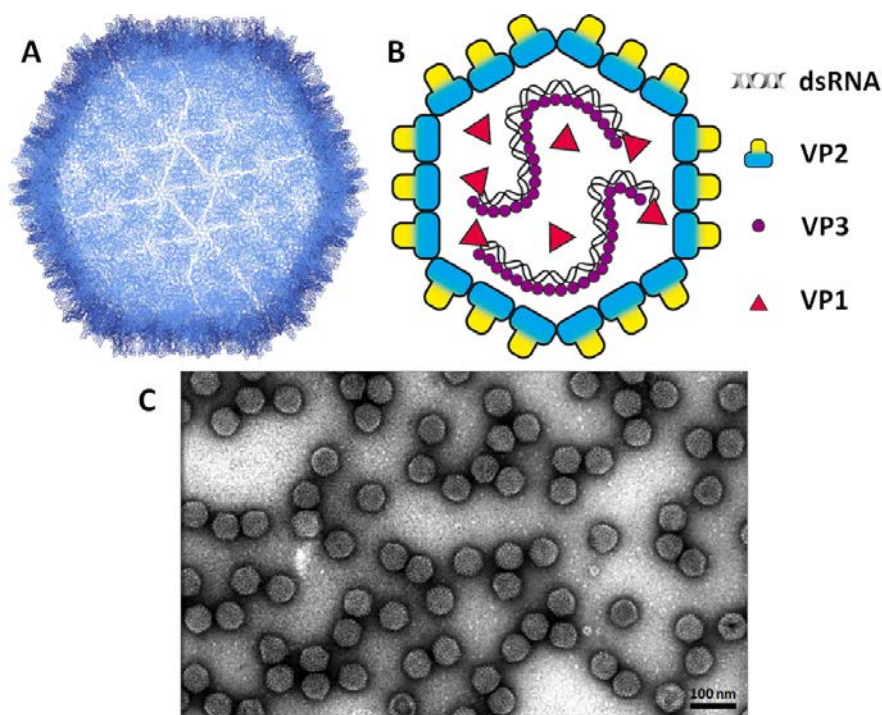


Figura 3. Estructura de IBDV. **A)** Diagrama de cintas de la superficie externa de una virión de IBDV, compuesta por 260 trímeros de la proteína estructural VP2. **B)** Representación gráfica que muestra un modelo de la estructura del virus y sus componentes, indicando la topología de las tres proteínas estructurales y del dsRNA bisegmentado (aunque se muestran solo dos segmentos genómicos, la mayoría de los virus infectivos contienen cuatro segmentos de dsRNA). Los complejos RNP formados por la asociación de las proteínas VP1 y VP3 al dsRNA genómico ocupan el espacio interior de la cápsida. (Ahlquist, 2005, Luque et al., 2009b). **C)** Micrografía obtenida en nuestro laboratorio en la que se observan viriones de IBDV sometidos a tinción negativa.

1.7. Ciclo de replicación de IBDV

La infección por IBDV se inicia mediante la unión del virión a la membrana celular a través de la interacción entre la proteína de la cápsida VP2 con la integrina $\alpha 4\beta 1$, un receptor de membrana muy abundante en diferentes tipos celulares, incluidos los linfocitos bursales (Delgui et al., 2009b). También se ha descrito que la proteína Hsp90 podría formar parte de un hipotético complejo receptor para IBDV (Lin et al., 2007). Tras la unión virus-receptor, el virión es internalizado mediante un mecanismo de macropinocitosis (Yip et al., 2012, Gimenez et al., 2015).

De acuerdo con el modelo propuesto (Delgui et al., 2013) (Figura 4), los bajos niveles de Ca^{2+} del endosoma promoverían el colapso de los trímeros de VP2 y el desensamblaje de la cápsida (Garriga et al., 2006). Esto, a su vez provocaría la liberación al interior del endosoma, tanto de los complejos RNP como de los péptidos anfipáticos generados durante el procesamiento del

precursor pVP2 descritos anteriormente. La inserción de estos péptidos, capaces de perforar membranas, en la membrana endosomal provocaría la disgregación del endosoma (Galloux et al., 2010) y la liberación subsecuente de los complejos RNP al citoplasma de la célula infectada. Los complejos RNP liberados iniciarían el proceso de transcripción/replicación del genoma viral. Los nuevos complejos RNP ensamblados se asociarían a vesículas endocíticas que circularían a través de microtúbulos hasta alcanzar la región perinuclear, estableciendo contacto físico con el aparato de Golgi, donde tendría lugar el ensamblaje de los nuevos viriones. Durante el proceso de replicación, no se produce un silenciamiento significativo de la traducción de proteínas celulares (Delgui et al., 2013).

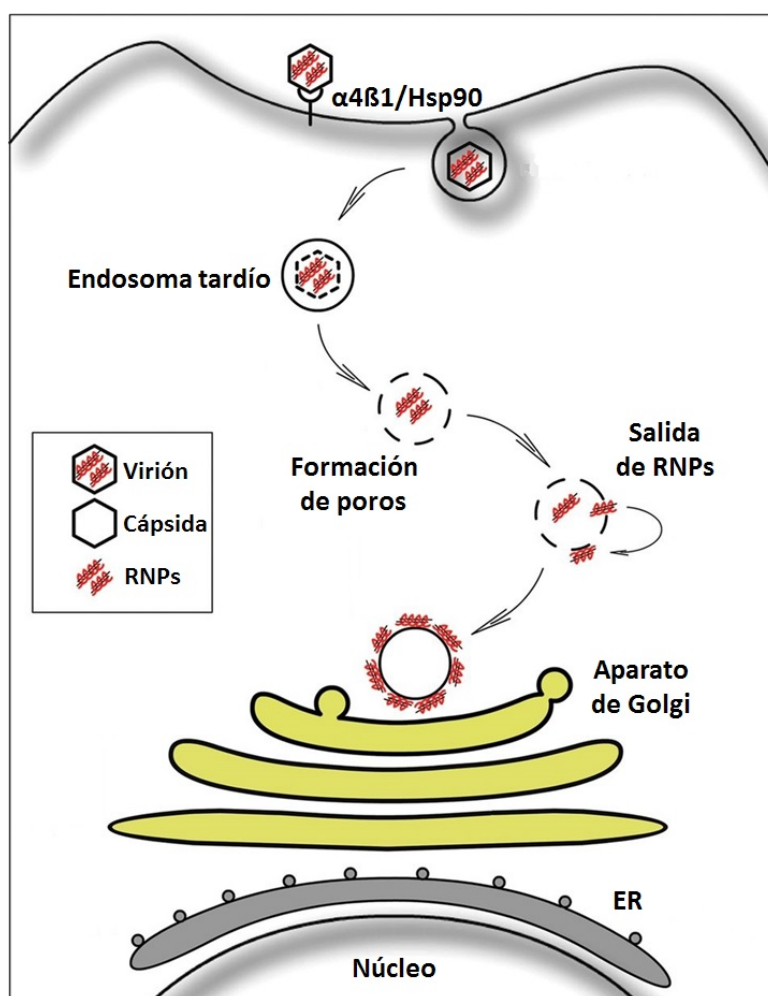


Figura 4. Modelo propuesto de liberación de los complejos RNP de IBDV. La integrina $\alpha 4 \beta 1$ y la proteína Hsp90 son componentes del complejo de receptores celulares que median en la infección por IBDV. Los viriones son internalizados a través de la vía endocítica. En el interior del endosoma, los trímeros de VP2 de la cápsida se desensamblan liberando tanto los complejos RNP como diferentes péptidos anfipáticos asociados a la cápsida. Estos últimos se asociarían a la membrana del endosoma provocando su perforación y la consecuente liberación de los complejos RNP permitiendo la activación del proceso de transcripción/replicación del genoma viral. Los nuevos complejos RNP ensamblados se asociarían a vesículas endocíticas que se trasladarían a través de microtúbulos hasta alcanzar la región perinuclear. Los complejos RNP se asociarían al aparato de Golgi donde se produce el ensamblado de la progenie viral. (Delgui et al., 2013)

Es importante remarcar que durante el periodo necesario para la acumulación de niveles significativos de proteína VP3 de nueva síntesis, los complejos RNPs son aparentemente más susceptibles a la detección por sensores celulares de dsRNA, especialmente por el TLR3 asociado a endosomas. Esta susceptibilidad podría estar significativamente potenciada en células activadas por interferón (IFN), las cuales poseen altos niveles de PKR activada, factores de transcripción implicados en la señalización de IFN (IRF-3, NFκB, IRF-1, STAT-1) (Colonna, 2007), así como mediadores apoptóticos (Bak, Bax, Bim, Caspasa 8) (Mukhopadhyay et al., 2014). El IFN previene la infección de una gran variedad de virus sin dañar a la célula. Sin embargo, la producción de este tipo de citoquinas también puede promover la muerte celular a través de la inducción de apoptosis vía FADD/Caspasa 8 (Lee et al., 2014). En este sentido, resultados recientes de nuestro laboratorio demuestran que la actividad autocrina del IFN producido en respuesta a la infección es responsable de la inducción de una importante respuesta apoptótica a tiempos tardíos de la infección (Cubas-Gaona et al., 2018).

Tras su ensamblado, los viriones se acumulan en el citoplasma formando inclusiones paracristalinas de gran tamaño. Hasta la realización del presente trabajo no se habían realizado estudios específicos para caracterizar el proceso de liberación de la progenie viral. Sin embargo, por la carencia de envuelta lipídica se asumía de forma general que, al igual que en otros virus desnudos, la liberación de los viriones de IBDV se produciría en un único evento temporal asociado a la destrucción de la integridad celular (Lwoff et al., 1955).

2. LA PROTEÍNA NO ESTRUCTURAL VP5

2.1. Generalidades sobre la proteína VP5 de IBDV

Como se ha descrito anteriormente, VP5 es una proteína no estructural de pequeño tamaño que da lugar a la formación de homo-oligómeros que se acumulan preferencialmente en la membrana plasmática (PM) de la células infectada (Figura 5). Se ha sugerido que esta proteína podría estar implicada en la liberación de las partículas virales en las células infectadas (Mundt et al., 1995, Lombardo et al., 2000, Tacken et al., 2003, Wu et al., 2009). Estudios realizados con mutantes de IBDV obtenidos mediante genética reversa mostraron que la proteína VP5 no es esencial para la replicación del virus, ni en cultivo celular (Mundt et al., 1997) ni en animales infectados experimentalmente (Yao et al., 1998). Sin embargo, estos mutantes presentan una fuerte atenuación, siendo incapaces de provocar lesiones bursales de importancia o signos clínicos de enfermedad (Schroder et al., 2001, Qin et al., 2010). Por otra parte, se ha demostrado

experimentalmente que, fuera del contexto de la infección, la sobreexpresión de VP5 exagera la motilidad celular y eventualmente provoca lisis celular. Estas observaciones sugieren que esta proteína podría inducir la reorganización del citoesqueleto y promover la permeabilización de las células infectadas (Lombardo et al., 2000).

Como se ha descrito anteriormente, el ORF de VP5 (ORF A1) se localiza en el extremo 5' del segmento A y está parcialmente solapado con el ORF A2 que codifica la poliproteína viral. Por tanto, la transcripción de este segmento da lugar a la síntesis de mRNAs bicistrónicos (Figura 2). El mecanismo que gobierna la traducción de estos dos ORFs no ha sido caracterizado, aunque estudios llevados a cabo por distintos laboratorios sugieren que durante la replicación de las cepas del virus adaptadas a cultivos celulares, las tasas de traducción de la proteína VP5 inferiores a las de la poliproteína (Mundt et al., 1997, Lombardo et al., 2000).

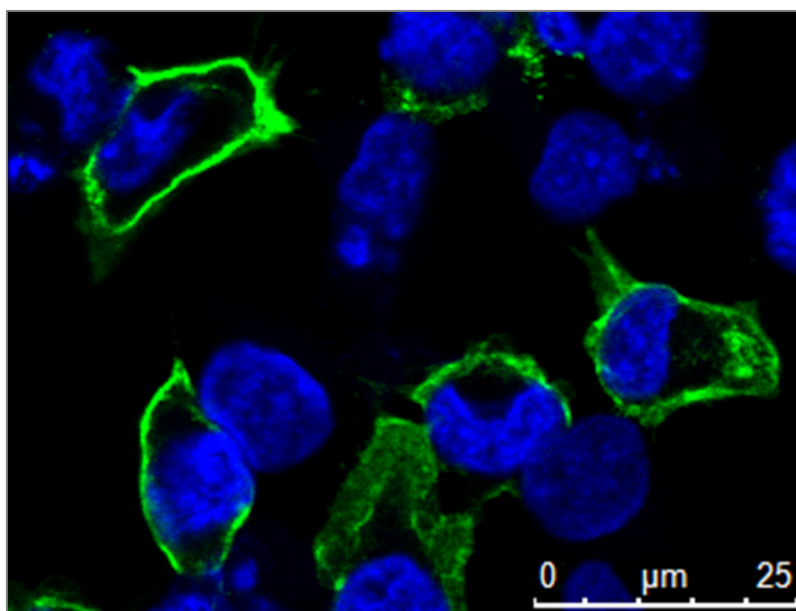


Figura 5. Localización subcelular de la proteína VP5 de IBDV. Análisis mediante inmunofluorescencia de células QM7 infectadas con el virus IBDV. La muestra, fijada a las 16 p.i., fue procesada mediante empleando un suero frente a la proteína VP5 (verde). Los núcleos celulares fueron teñidos mediante incubación con DAPI (azul).

La proteína VP5 es un polipéptido huérfano carente de homólogos conocidos (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los únicos ortólogos de VP5 se encuentran en genomas de virus pertenecientes a dos de los cuatro géneros de birnavirus (*Avibirnavirus* y *Aquabirnavirus*), lo que sugiere que este ORF se generó de manera tardía durante la evolución de los birnavirus. De acuerdo a análisis bioinformáticos, la aparición de este nuevo ORF tuvo lugar mediante un proceso de sobreimpresión génica a partir del gen ancestral de la poliproteína (Rancurel et al., 2009).

2.2. Papel de la proteína VP5 durante la replicación de IBDV

Tal como indican varios investigadores, la expresión de VP5 en las células infectadas por IBDV produce un aumento en la cantidad de progenie viral y promueve la liberación del virus (Mundt et al., 1997, Wu et al., 2009). Sin embargo, la información acerca del papel específico de la proteína VP5 durante la replicación de IBDV es escasa y contradictoria. Mientras algunos artículos la describen como una proteína proapoptótica (Yao et al., 1998, Li et al., 2012), otras publicaciones sugieren que juega un papel anti-apoptótico (Liu and Vakharia, 2006, Wei et al., 2011).

Se han publicado diferentes artículos describiendo posibles interacciones de la proteína VP5 con diferentes polipéptidos de la célula huésped: i) el receptor 1 de la proteína quinasa C activada (RACK1) (Boot et al., 2001), una proteína de andamiaje que interactúa con un gran número de proteínas celulares implicadas en una amplia variedad de procesos celulares, tales como señalización por IFN, proliferación, movimiento, muerte y supervivencia celular (Gandin et al., 2013); ii) la subunidad regulatoria p85 α de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). Esta interacción provocaría la activación de la vía de señalización PI3K/Akt promoviendo la supresión de la apoptosis prematura inducida por la infección (Wei et al., 2011), empleando un mecanismo similar al descrito con diferentes proteínas virales capaces de sobre activar la vía PI3K/Akt con el fin de mantener infecciones más duraderas en el tiempo (Cooray, 2004). Un ejemplo de este mecanismo se ha documentado con la proteína NS1 del virus de la gripe. NS1 usa un motivo de unión a dominios SH3 para interactuar con el dominio SH3 de la subunidad p85 α de PI3K (Shin et al., 2007); iii) la proteína mitocondrial denominada canal selectivo de aniones dependiente de voltaje 2 (VDAC2). Esta interacción provocaría la inducción de una respuesta apoptótica y la consecuente reducción del tamaño de la progenie viral (Li et al., 2012); y iv) finalmente, se ha descrito que la proteína VP5 podría formar un complejo con las proteínas RACK1 y VDAC2 que bloquearía la respuesta apoptótica activada por la infección viral (Lin et al., 2015).

2.3. Análisis de secuencia de la proteína VP5 de IBDV

El estudio *in silico* de la secuencia de VP5 aporta información relevante. Como se ha comentado anteriormente, la proteína VP5 está compuesta por 145 aminoácidos y tiene una masa molecular de 16,5 kDa, aunque presenta una movilidad electroforética de \approx 19 kDa en SDS-PAGE. Esta disparidad entre la masa molecular teórica y la observada sugiere que la proteína podría sufrir modificaciones post-traduccionales (PTMs). El análisis bioinformático de la secuencia de VP5 empleando los programas de predicción alojados en el servidor GPS (<http://gps.biocuckoo.org/>),

muestra la susceptibilidad potencial de la proteína a sufrir fosforilaciones y palmitoilaciones. Por un lado, este servidor predice la posibilidad de que diferentes aminoácidos (^3S , ^7T , ^{11}S , ^{18}S , ^{21}T , ^{24}S , ^{30}S , ^{36}T , ^{40}S , ^{82}S , ^{95}S , ^{113}S , ^{115}S , ^{119}S y ^{131}T) puedan sufrir fenómenos de fosforilación (Xue et al., 2008). Por otra parte, también detecta una posible palmitoilación del residuo ^{23}C (Ren et al., 2008) (Figura 6).

```

      10           20           30           40           50
MVSRDQTNDR SDDKPARSNP TDCSVHTEPS DANNRTGVHS GRHPGEAHSQ
      60           70           80           90          100
VRDLDLQFDC GGHRVRANCL FFWIPWLNCG CSLHTAGQWE LQVRSDAPDC
      110          120          130          140
PEPTGQLQLL QASESESHSE VKHTSWWRLC TKRHHKRRDL PRKPE

```

Figura 6. Secuencia primaria de la proteína VP5 de la cepa Soroa. Los aminoácidos susceptibles de sufrir fosforilación o palmitoilación están marcados en color rojo y verde, respectivamente. La predicción se realizó empleando programas de predicción alojados en el servidor GPS. Los aminoácidos marcados en color azul corresponden a residuos electropositivos localizados en el extremo C-terminal de la proteína. Los aminoácidos marcados en amarillo forman tres regiones ricas en residuos de prolina que corresponden a posibles sitios de interacción con dominios SH3. Los aminoácidos subrayados corresponden a un posible dominio transmembranal.

La proteína VP5 posee tres zonas ricas en aminoácidos de prolina ($^{69}\text{CLFPWIP}^{75}$, $^{95}\text{SDAPDCP}^{101}$, and $^{138}\text{RDLPRKP}^{144}$), que atendiendo a su secuencia podrían actuar como sitios de unión a dominios SH3 (Figura 6). Los dominios SH3 son módulos proteicos que median en las interacciones proteína-proteína comúnmente empleados por quinasas, fosfolipasas y GTPasas para identificar a sus proteínas diana. Las interacciones mediadas por dominios SH3 juegan un papel clave en procesos fundamentales tales como la transducción de señal, el remodelamiento de membranas y el reordenamiento del citoesqueleto (Li, 2005).

Las predicciones topológicas de la secuencia de la proteína VP5 usando los servidores TM pred (Hofmann and Stoffel, 1993) y TopPred (Claros and von Heijne, 1994), muestran la existencia de una región ligeramente hidrofóbica compuesta por los aminoácidos $^{69}\text{CLFPWIPWLNCGSLHTAGQ}^{88}$, que podrían formar una α -hélice transmembrana (Figura 6). Aunque hasta la realización de este trabajo no se había estudiado el mecanismo por el cual la proteína VP5 se localiza en la PM de las células infectadas, la existencia de este posible dominio transmembrana permitió hipotetizar que VP5 podría comportarse como una proteína de membrana de tipo II (Lombardo et al., 2000), que podría actuar como viroporina (Nieva et al., 2012). Sin embargo, análisis topológicos subsecuentes realizados con programas que utilizan algoritmos más refinados,

como SPOCTOCUS (Viklund et al., 2008), PHOBIUS (Kall et al., 2004), DAS (Cserzo et al., 2002) y HMMTOP (Tusnady and Simon, 2001); no detectan la presencia de posibles α -hélices anfipáticas en la secuencia primaria de la proteína.

Soroa	HTSWWRLCTKRHHKRRDLPRKPE
Cu1	HTSWWRLCTKRHHKRRDLPRKPE
CEF94	HTSWWRLCTKRHHKRRDLPRKPE
D6948	HTPWWRLCTKWHHKRRDLPRKPE
UPM97/61	HTPWWRLCTKWHHKRRDLPRKPE
23/82	HTPWWRLCTKRNHKRSDDLPRKPE
OH	HTPWWRLCSKWDHKRGDLPRKPE

Figura 7. Alineamiento múltiple de secuencia correspondiente a los 23 aminoácidos C-terminales de la proteína VP5 codificada por el genoma de varias cepas de IBDV pertenecientes a diferentes patotipos. Cepas Soroa (número de acceso: AF140705), Cu1 (D00867) y CEF94 (AF194428) de virulencia clásica (CV) del serotipo I; cepas D6948 (AF240686) y UPM97/61 (AF247006) muy virulentas (VV) del serotipo I; y cepas 23/82 (AF362773) y OH (IBU30818) apatogénicas del serotipo II. Los aminoácidos electropositivos conservados están marcados en azul.

Finalmente, el extremo C-terminal de la proteína VP5 contiene una región policationica con una alta concentración de aminoácidos básicos ($^{132}\text{KR}^{133}$, $^{136}\text{KRR}^{138}$ y $^{142}\text{RK}^{143}$) (Figura 6). Una comparación de la secuencia de VP5 de cepas clásicas y muy virulentas del serotipo I y avirulentas del serotipo II, indica que esta región está altamente conservada (Figura 7). Esta región policationica es similar a la detectada en determinadas proteínas celulares, como las GTPasas de las familias Ras, Rho, Arf y Rab (Goldenberg and Steinberg, 2010), que emplean dominios C-terminales cargados positivamente para unirse, a través de interacciones electrostáticas, a lípidos aniónicos, principalmente fosfoinosítidos (PIP), anclados a la cara citoplasmática de diferentes compartimentos membranales (Heo et al., 2006). La presencia de esta región podría jugar un importante papel en el tropismo membranar de VP5.

En la actualidad, no existe información con respecto a la estructura atómica de la proteína. Desgraciadamente, la validez de las predicciones estructurales generadas *in silico* se ve fuertemente lastrada por la inexistencia de proteínas ortólogas previamente caracterizadas (Ganguly and Rastogi, 2018).

3. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS FOSFOINOSÍTIDOS

Los PIPs son derivados fosforilados del fosfatidilinositol (PI). El PI pertenece a una familia de lípidos denominados glicerofosfolípidos, y está compuesto por un núcleo central de glicerol al que se le unen dos colas de ácidos grasos no polares (habitualmente ácido esteárico en la posición

1 y ácido araquidónico en la posición 2) y un grupo fosfato (en la posición 3), que a su vez está unido a una cabeza polar de inositol. De esta manera, el PI se considera un lípido anfipático, al presentar unas colas hidrofóbicas, no polares, y una cabeza polar ([Mathews et al., 2000](#)). El anillo de inositol puede ser fosforilado por diferentes quinasas en las posiciones 3, 4 y 5 de los grupos hidroxilo, pero no en las posiciones 2 y 6 debido a impedimentos estéricos (**Figura 8**).

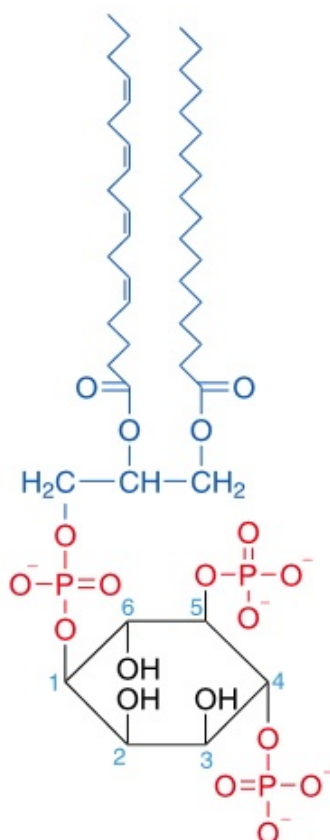


Figura 8. Representación de la estructura química del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PI(4,5)P₂). El PI(4,5)₂ está compuesto por una cola hidrofóbica no polar formada por un núcleo central de glicerol, al que se le unen el ácido esteárico en la posición 1 y el ácido araquidónico en la posición 2; y una cabeza polar con carga negativa formada por un grupo fosfato unido en la posición 3 del glicerol, que conecta con el anillo de inositol al que se le unen en sus posiciones 4 y 5 otros grupos fosfato. Según el tipo de PIP en cuestión, este podrá presentar fosforiladas o defosforiladas las posiciones 3, 4 y 5 del inositol.

Según las posiciones fosforiladas del anillo de inositol, podemos encontrar siete combinaciones posibles de PIPs en células animales: i) especies monofosfato, PI 3-fosfato (PI(3)P), PI 4-fosfato (PI(4)P) y PI 5-fosfato (PI(5)P); ii) especies bifosfato, PI 3,4-bifosfato (PI(3,4)P₂), PI 3,5-bifosfato (PI(3,5)P₂) y el PI 4,5-bifosfato (PI(4,5)P₂); iii) y la especie trifosfato, representada por PI 3,4,5-trifosfato (PI(3,4,5)P₃). Los grupos fosfatos unidos a la cabeza polar de inositol aportan a las moléculas PIPs una carga neta negativa a pH fisiológico, por lo que se les considera como los fosfolípidos más ácidos ([Mueller-Roeber and Pical, 2002](#)).

Los PIPs se localizan predominantemente en la cara citosólica de las membranas de diversos orgánulos celulares y constituyen un pequeño, pero esencial, porcentaje del contenido total de fosfolípidos presentes en membranas eucarióticas. Entre estos orgánulos, encontramos al PI(3)P situado predominantemente en endosomas tempranos, al PI(4)P en PM y la red trans Golgi, al PI(3,4)P₂ en PM, al PI(3,5)P₂ en endosomas tardíos, al PI(4,5)P₂ en PM y al PI(3,4,5)P₃ en PM (van Meer et al., 2008) (Figura 9).

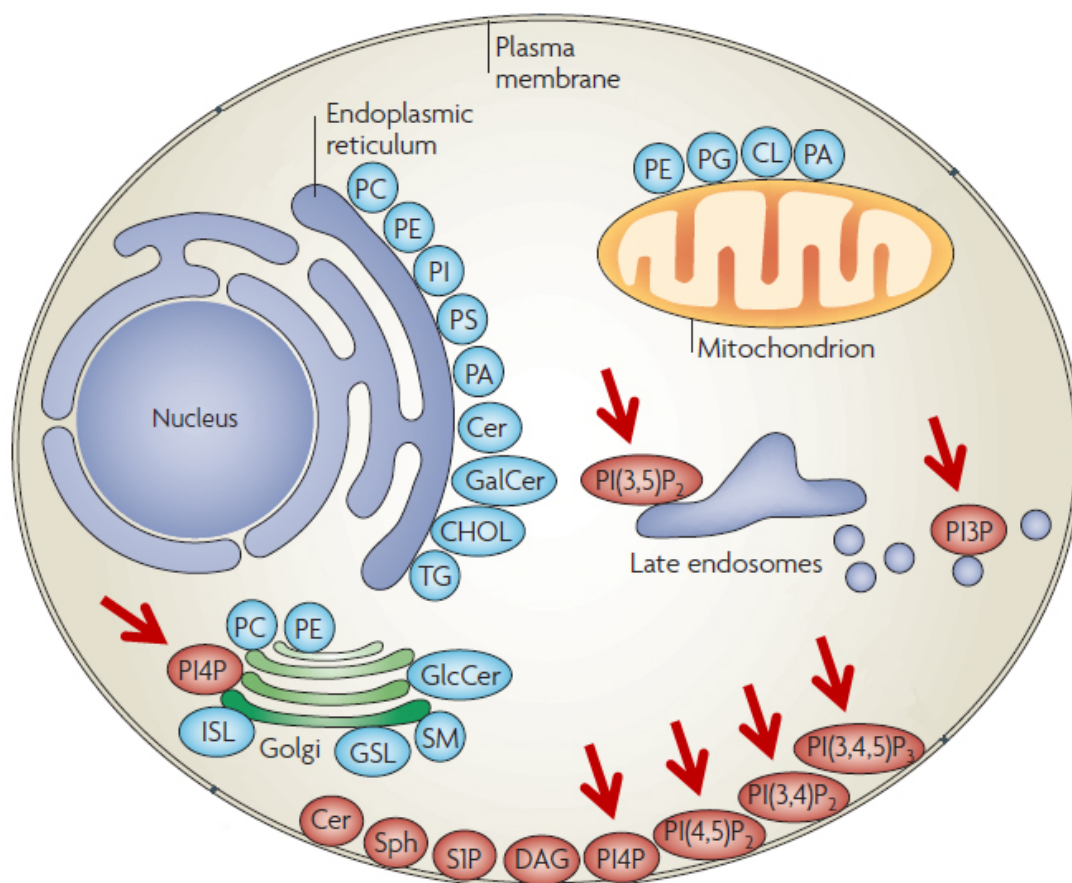


Figura 9. Distribución subcelular de los lípidos presentes en la cara citosólica de distintas membranas celulares. El esquema representa la distribución subcelular de los distintos lípidos localizados en la cara citosólica de las distintas membranas presentes en células de mamífero y levaduras (van Meer et al., 2008).

Los PIPs están asociados a tres procesos de gran importancia para la homeostasis celular, como son el establecimiento de la identidad de la membrana de diversos orgánulos celulares, la señalización celular y el tráfico membranal (Heo et al., 2006). Para su función en procesos de señalización en membrana, los PIPs interaccionan con una gran variedad de proteínas. Las interacciones electrostáticas entre su cabeza polar cargada negativamente y los dominios básicos de las proteínas a las que se unen (tales como GTPasas de membrana) son relativamente débiles (Goldenberg and Steinberg, 2010) y requieren de la colaboración de otras proteínas de membrana,

que habitualmente funcionan como correceptores que emplean módulos específicos de unión a proteínas, tales como dominios de unión SH3, para reclutar proteínas y transportar proteínas citosólicas a compartimentos membranales específicos ([Balla, 2013](#)). Además de su papel como transductores de señales en la superficie de membranas, los PIPs intervienen una amplia variedad de procesos, incluyendo la reorganización del citoesqueleto y de la membrana, la regulación del transporte vesicular y la función secretora del aparato de Golgi. Los PIPs y sus subproductos también participan en una gran variedad de vías de señalización. De hecho, muchos patógenos, incluyendo diferentes virus, codifican proteínas que actúan sobre diferentes PIPs. Algunas de estas proteínas están directamente implicadas en patogénesis y juegan un papel fundamental en procesos de entrada y/o salida de diferentes virus, en la morfogénesis y en la desestabilización de la maquinaria basada en PIPs para evadir la acción de diversos mecanismos de respuesta innata de la célula huésped ([Jun et al., 2013](#), [Takahashi and Suzuki, 2011](#)).

Objetivos

Debido a su enorme impacto sobre la industria avícola mundial, IBDV es considerado como uno de los patógenos aviares de mayor relevancia económica. Sin embargo, tanto los mecanismos moleculares que regulan la virulencia como algunos aspectos fundamentales del ciclo de replicación de IBDV siguen siendo poco conocidos.

Como se ha mencionado anteriormente, estudios realizados por diferentes laboratorios demuestran que la eliminación de la proteína VP5 provoca una fuerte atenuación del virus que se evidencia en la ausencia de lesiones bursales y síntomas clínicos en pollos inoculados experimentalmente. Estos resultados indican que la proteína VP5 juega un papel clave en la interacción de IBDV con su hospedador. Sin embargo, y a pesar de su importancia, la información estructural y funcional acerca de esta proteína sigue siendo muy escasa.

El objetivo general de esta tesis doctoral es caracterizar el papel funcional de la proteína VP5 durante el proceso de replicación de IBDV y su posible contribución en el mecanismo(s) de diseminación del virus. Para ello, se propusieron los siguientes objetivos concretos:

1. Caracterizar la expresión de VP5 durante el ciclo replicativo de IBDV.
2. Determinar la función(es) de la proteína.
3. Analizar el posible papel de esta proteína en el proceso de liberación de la progenie.
4. Estudiar el mecanismo de interacción de la proteína con membranas celulares.

Materiales y métodos

1. Células, virus, infecciones y transfecciones

Se han empleado cultivos de células HeLa (células epiteliales de cáncer cervical humano, número CCL-2TM de la ATCC), DF-1 (fibroblastos embrionarios de pollo transformados espontáneamente, número CRL-12203 de la ATCC), BSC40 (células epiteliales de riñón de mono verde africano, número CRL-2761 de la ATCC) y QM7 (mioblastos musculares de codorniz, número CRL-1962 de la ATCC). Las diferentes líneas celulares fueron crecidas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma) suplementado con penicilina (100 U/ml) (Sigma), estreptomicina (100 mg/ml) (Sigma) y 5% de suero fetal de ternera (FCS) (Sigma).

Los virus vacunales recombinantes (VACV) VT7/FVP5, VT7/FVP5 Δ 5, VT7/FVP5 Δ 10, VT7/FVP5 Δ 15, VT7/FVP5M1, VT7/FVP5M2, VT7/FVP5M3, y VT7/FVP5M4 empleados en este trabajo fueron generados y amplificados como se describe más adelante (ver sección “Generación de VACV recombinantes”) en cultivos de células BSC40. Las titulaciones de virus fueron realizadas por triplicado usando un ensayo de placa mediante tinción con cristal violeta. Las monocapas de células BSC40 crecidas en placas de cultivos de seis pocillos fueron infectadas con diluciones seriadas de los distintos virus. Tras 1 h de absorción del virus a 37°C, las monocapas fueron cubiertas con medio semisólido compuesto por DMEM, 0,7% agar noble (Conda) y 2% de FCS. Los cultivos celulares fueron incubados durante 72 h a 37°C. A continuación, el medio semisólido fue eliminado cuidadosamente, y tras lavar los pocillos con tampón fosfato salino (PBS) frío, las monocapas fueron fijadas con una solución de formaldehído al 10% (Sigma) y teñidas con cristal violeta al 2,3% (Sigma). Las infecciones con estos virus fueron realizadas en células HeLa mediante diluciones de stocks virales en DMEM, a la multiplicidad de infección (MOI) indicada. Tras lavar con PBS, las monocapas fueron incubadas con suspensiones de virus durante 1 h a 37°C. Tras la adsorción viral, el medio fue reemplazado por DMEM fresco suplementado con FCS al 2%. La expresión de los genes inducibles se realizó a los tiempos p.i. indicados mediante la adición al medio de cultivo de 1mM isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Apollo Scientific).

Los virus IBDV-WT, IBDV-VP5-KO, IBDV-VP5 Δ 3CT, IBDV-VP5 Δ 10CT y IBDV-VP5 Δ 14CT empleados en este trabajo son derivados de la cepa Soroa de IBDV, un virus de serotipo I aislado en Cuba y adaptado a crecer en cultivos celulares. Estos virus fueron generados mediante genética reversa y amplificados como se describe más adelante (ver sección “Generación de los virus IBDV mutantes”) en células QM7. Las titulaciones de IBDV fueron realizadas por triplicado usando un ensayo de placa de lisis descrito más adelante (ver sección “Ensayo de placa para IBDV”) en células QM7. Las infecciones con estos virus fueron realizadas en células QM7 o DF-1 mediante dilución

en DMEM del stock viral correspondiente. Tras lavar con PBS, las monocapas fueron incubadas con la suspensión de virus durante 1 h a 37°C. Tras la absorción, el medio fue reemplazado por DMEM fresco suplementado con FCS al 2% durante el tiempo indicado. Para la titulación del virus, las monocapas fueron resuspendidas empleando una espátula y a continuación centrifugadas a baja velocidad (2.000xg durante 5 min) para eliminar los restos celulares. Los sobrenadantes resultantes fueron empleados para determinar el título viral extracelular. Para determinar el título viral intracelular, los sedimentos celulares fueron resuspendidos en medio fresco y sometidos a tres ciclos de sonicación durante 10 seg a 4°C empleando un aparato Sonifier S-450 (Branson Ultrasonics), para desprender las partículas del virus de los restos celulares.

Las transfecciones de los plásmidos pEGFP, pEGFP/VP5 y pEGFP/CT122-145, generados como se describe más adelante (ver sección “Generación de plásmidos), fueron llevadas a cabo en monocapas de células HeLa preconfluentes. Las transfecciones realizadas en este trabajo se realizaron con 100 ng de DNA plasmídico por cada 10⁵ células, empleando Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

2. Generación de VACV recombinantes

El estudio del papel del dominio C-terminal de VP5 en la localización subcelular de la proteína se llevó a cabo mediante la expresión de versiones mutantes, de delección y de sustitución (*alanine scanning*) del gen que codifica VP5, en cultivos infectados con VACV recombinantes. Los mutantes de delección fueron generados mediante PCR empleando como molde el plásmido pT7-SA-Rz (Irigoyen et al., 2009). Las reacciones se realizaron utilizando un único oligonucleótido directo 5'-CGCGCTCGAGCATATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGTTAGTAGAGATCAGACAAACG (*Sigma*), que incluye la secuencia codificante correspondiente al epítipo FLAG (DYKDDDDK), precedido por un ATG iniciador y localizado inmediatamente delante de una secuencia de 25 nucleótidos que hibridan con el ORF de VP5, inmediatamente detrás de su ATG iniciador. Como oligonucleótidos inversos se emplearon los siguientes oligonucleótidos: 5'-GCGCGGATCCTCACTCAGGCTTCCTTGGAAGGTC (FVP5), 5'-GCGCGGATCCTCAAAGGTCACGGCGTTTATGGTG (delección de 5 aminoácidos; FVP5Δ5), 5'-GCGCGGATCCTCAATGGTGCCGTTTATGTCATAAAC (delección de 10 aminoácidos; FVP5Δ10) o 5'-GCGCGGATCCTCAGCATAAACGCCACCAGGAAGTG (delección de 15 aminoácidos; FVP5Δ15), respectivamente. Los fragmentos de DNA generados fueron digeridos con NdeI (*New England Biolabs*) y BamHI, y clonados en el vector de inserción/expresión pVOTE.2 (Ward et al., 1995) digerido con las mismas enzimas. Los plásmidos resultantes fueron

denominados pVOTE.2/FVP5, pVOTE.2/FVP5Δ5, pVOTE.2/FVP5Δ10 y pVOTE.2/FVP5Δ15, respectivamente.

Los mutantes de sustitución de FVP5 fueron generados mediante síntesis génica (*GeneScript*). Las secuencias de estos mutantes incluyen las siguientes sustituciones de nucleótidos: FVP5M2, A⁴⁴⁸→G, G⁴⁴⁹→C, G⁴⁵⁰→A, A⁴⁵¹→G, A⁴⁵²→C y G⁴⁵³→T; FVP5M3, A⁴³⁰→G, A⁴³¹→C, C⁴³³→G, G⁴³⁴→C, C⁴³⁵→T, C⁴³⁶→G y G⁴³⁷→C; FVP5M4, A⁴¹⁸→G, A⁴¹⁹→C, C⁴²¹→G, G⁴²²→C y G⁴²³→T. El mutante FVP5M1, contiene la suma de sustituciones introducidas en los mutantes FVP5M2, FVP5M3 y FVP5M4. Los mutantes de sustitución fueron clonados en el plásmido pVOTE.2 siguiendo una estrategia de clonaje similar a la descrita para los mutantes de delección. Los plásmidos resultantes se denominaron pVOTE.2/FVP5M1, pVOTE.2/FVP5M2, pVOTE.2/FVP5M3 y pVOTE.2/FVP5M4, respectivamente. Todos los plásmidos generados fueron secuenciados para comprobar la corrección de los insertos. A continuación se emplearon para generar los siguientes VACVs recombinantes: VT7/FVP5, VT7/FVP5Δ5, VT7/FVP5Δ10, VT7/FVP5Δ15, VT7/FVP5M1, VT7/FVP5M2, VT7/FVP5M3, y VT7/FVP5M4. La generación de los VACVs recombinantes fue realizada mediante la infección de células BSC40 con el virus VT7LacOI ([Ward et al., 1995](#)), un VACV recombinante que expresa la RNA polimerasa del bacteriófago T7 de manera inducible por IPTG, seguido de transfección con los plásmidos correspondientes. La selección y amplificación de los VACVs recombinantes se realizó siguiendo un protocolo descrito previamente ([Ward et al., 1995](#)).

3. Generación de virus IBDV mutantes

La introducción de mutaciones en el genoma de IBDV se realizó mediante mutagénesis dirigida, empleando como molde el plásmido pT7-SA-Rz. Se utilizaron las siguientes parejas de oligonucleótidos: VP5-KO, 5'-AACGCTATCATTGATAGTTAGTAGAGATCAG y 5'-CTGATCTCTACTAACTATCAATGATAGCGTT; VP5Δ3CT, 5'-CATAAACGCCGTGACCTTCCAAGGTAGCCTGAGTGAAGTACAGATG y 5'-CATCTGTCAGTTCACTCAGGCTACCTTGGAAAGGTCACGGCGTTTATG; VP5Δ10CT, 5'-GTTTATGCCTAAACGGCACCATTAAACGCCGTGACCTTCCAAG y 5'-CTTGGAAAGGTCACGGCGTTAATGGTGCCGTTTAGTGCATAAAC; VP5Δ14CT, 5'-CCTGGTGGCGTTTATGCACTTAACGGCACCATAAACGCCGTG-3' y 5'-CAGCGCGTTTATGGTGCCGTTAAGTGCATAAACGCCACCAGG; para generar los plásmidos pT7-SA-Rz/VP5-KO, pT7-SA-Rz/VP5Δ3CT, pT7-SA-Rz/VP5Δ10CT, pT7-SA-Rz/VP5Δ14CT, respectivamente. Estos plásmidos, junto con el plásmido pT7-SA-Rz original, fueron analizados para determinar la corrección de las secuencias insertadas. Posteriormente, los plásmidos se emplearon para obtener y amplificar los virus mutantes IBDV-VP5-KO, IBDV-VP5Δ3CT, IBDV-VP5Δ10CT, IBDV-VP5Δ14CT e

IBDV-WT, respectivamente; mediante genética reversa de acuerdo al protocolo que se describe más adelante.

El virus IBDV-WT es una versión no modificada de la cepa Soroa de IBDV generado mediante genética reversa. El virus IBDV-VP5-KO contiene una única sustitución nucleotídica en el segmento A del genoma viral, G⁹⁸→A, que elimina el codón de iniciación del ORF A1, lo que impide la expresión de la proteína VP5 (Mundt et al., 1997). Los virus IBDV-VP5Δ3CT, IBDV-VP5Δ10CT, IBDV-VP5Δ14CT contienen una única sustitución nucleotídica A⁴⁸⁹→U, A⁵⁰¹→U o A⁵²²→U en el segmento A, respectivamente. Estas mutaciones convierten los codones correspondientes a los aminoácidos K¹³² y K¹³⁶ de VP5, o el codón correspondiente al residuo K¹⁴² de VP5, en codones de terminación. De esta forma, estos mutantes expresan formas truncadas, carentes de 3, 10 y 14 aminoácidos, respectivamente, en el extremo C-terminal de la proteína.

Las distintas versiones de los plásmidos pT7-SA-Rz y el pT7-SB-Rz (Irigoyen et al., 2009) contienen el cDNA completo correspondiente a la cadena positiva de los segmentos A y B de la cepa Soroa de IBDV, respectivamente. Los cDNAs de ambos segmentos se encuentran flanqueados por la secuencia del promotor de la RNA polimerasa del bacteriófago T7 (en posición 5') y por la secuencia de la ribozima del virus de la Hepatitis δ (en posición 3').

Cultivos de células QM7 fueron cotransfectados con cada una de las distintas versiones mutantes del plásmido pT7-SA-Rz junto con el plásmido pT7-SB-Rz, empleando *Lipofectamine 2000*. A las 6 h post-transfección, los cultivos fueron infectados con el virus VT7LacOI (Ward et al., 1995) a una MOI de 1 unidad formadora de placa (PFU) por célula, y posteriormente mantenidos a 37°C en DMEM suplementado con 2% FCS y 1 mM IPTG. A las 72 h p.i., los cultivos fueron recogidos y sometidos a 3 ciclos de congelación/descongelación. Tras la eliminación de los restos celulares mediante centrifugación a baja velocidad (2.000xg durante 5 min), los sobrenadantes fueron filtrados a través de un filtro *Millex* de 0,1 μm (*Millipore*) para eliminar los virus VACV. Los filtrados fueron empleados para infectar monocapas de células QM7. A las 72 h p.i., los cultivos fueron recogidos y empleados para amplificar los virus IBDV recombinantes.

4. Ensayo de placa para IBDV

Se emplearon monocapas preconfluentes (50%) de células QM7 crecidas en placas de cultivos de 6 pocillos. Las monocapas fueron infectadas con diluciones seriadas de los distintos virus. Tras 1 h de adsorción a 37°C, los cultivos fueron cubiertos con medio semisólido compuesto por DMEM, 0,7% agar noble y 2% FCS; y mantenidos a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂.

durante 72 h. A continuación, el medio semisólido fue eliminado cuidadosamente, y tras dos lavados con PBS frío (4°C), las monocapas fueron fijadas con metanol/acetona (v/v) durante 5 min a -20°C, y posteriormente secadas a temperatura ambiente (RT). Posteriormente, las monocapas fueron lavadas dos veces con PBS, y bloqueadas durante 30 min a RT con PBS suplementado con 3% FCS. Transcurrido este periodo, las monocapas fueron incubadas con suero anti-VP2 de conejo ([Fernandez-Arias et al., 1998](#)) diluido en PBS suplementado con 3% FCS durante 90 min a RT. Tras un tres lavados con PBS, las monocapas fueron incubadas con anticuerpo Ig de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa (*Sigma*) en PBS 3% FCS durante 1h. Tras tres lavados con PBS, las muestras fueron incubadas con solución sustrato 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB) (*Sigma*) en presencia de H₂O₂. El análisis estadístico de los datos correspondientes a las titulaciones se realizó empleando el programa *GraphPad Prism* (*GraphPad Software*). El análisis del tamaño de placas de lisis se llevó a cabo empleando el test de Kruskal-Wallis seguido de un test de comparaciones múltiples de Dunn entre las áreas de las placas de lisis detectadas en las monocapas infectadas con los diferentes virus mutantes frente a las generadas por el virus IBDV-WT. Los datos presentados corresponden a tres experimentos independientes totalizando un mínimo de 750 placas para cada virus analizado.

5. Generación de plásmidos

El plásmido pEGFP/VP5 fue generado clonando un fragmento de DNA generado mediante PCR usando los oligonucleótidos 5'-GCGCGCGAATTCTATGGTTAGTAGAGATCAGACA y 5'-GCGCGCGGATCCCTCAGGCTTCCTTGGAAGGTC y empleando como molde el plásmido pBSK/VP5 ([Lombardo et al., 2000](#)). El fragmento de DNA resultante fue digerido con las enzimas EcoRI y BamHI, y clonado en el plásmido pEGFP-C1 (*Clontech*) digerido con las mismas enzimas. El plásmido pEGFP/CT122-145 fue generado clonando un fragmento de DNA generado mediante la hibridación de los oligonucleótidos 5'-AATTCAAAGCACACCAGCTGGTGGAGGCTGTGCACCAAGAGGCACCACAAGAGGAGGGACCTGCCCAGGAAGCCCGAGTAAG y 5'-GATCCTTACTCGGGCTTCCTGGGCAGGTCCCTCCTTGTGGTGCCTCTTGGTGACAGCCTCCACCAGCTGGTGTGCTTTG con el vector pEGFP-C1 (*Clontech*), ambos digeridos con EcoRI y BamHI. Los plásmidos fueron secuenciados para determinar la corrección de las secuencias insertadas.

6. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes VP5 marcadas con el epítipo FLAG a partir de cultivos bacterianos

Los fragmentos de DNA conteniendo los genes recombinantes FVP5, FVP5 Δ 15, y FVP5M1 fueron aislados mediante digestión con NdeI y BamHI a partir de los plásmidos pVOTE.2/FVP5, pVOTE.2/FVP5 Δ 15 y pVOTE.2/FVP5M1, respectivamente; y posteriormente clonados en el vector de expresión procariota pRSETA (*Invitrogen*) digerido con las mismas enzimas. La restricción de pRSETA con NdeI y BamHI elimina del plásmido el ATG iniciador, el tag de 6xhistidinas, el epítipo Xpress y la secuencia de reconocimiento de corte de la enteroquinasa. En consecuencia, los genes FVP5 recombinantes se situaron a continuación del sitio de unión del ribosoma, permitiendo la expresión de proteínas recombinantes que carecen de secuencias heterólogas codificadas por el vector de expresión. Los correspondientes derivados de pRSETA fueron empleados para transformar células *E.coli* BL21(DE3)pLysS (*Promega*) competentes. La expresión de las proteínas recombinantes fue realizada a 18°C durante 16h de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. A continuación, los cultivos fueron sedimentados mediante centrifugación a 6.000xg durante 15 min a 4°C, y resuspendidos en tampón de lisis (50 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl, 0,1% Igepal y 50 μ g/ml lisozima), suplementado con inhibidores de proteasas *cOmplete Mini EDTA-free* (*Roche*). Tras 30 min a 37°C, las muestras fueron sonicadas, suplementadas con 5 unidades/ml de DNaseI (*Roche*) y MgCl₂ hasta alcanzar una concentración final de 10 mM, y posteriormente incubadas durante 15 min a 37°C. Tras la incubación, las muestras fueron centrifugadas a 15.000xg durante 15 min a 4°C para eliminar residuos de mayor tamaño. El sobrenadante obtenido fue sometido a una segunda centrifugación a 100.000xg durante 1h a 4°C. El sobrenadante resultante fue sometido a una purificación mediante cromatografía de afinidad usando *anti-FLAG M1 Agarose Affinity Gel* (*Sigma*) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Las muestras de proteína purificada fueron dializadas frente a tampón PBS usando *Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette G2 3 ml 10K* (*Thermo Scientific*), concentradas usando filtros *Amicon* de 10.000 MWCO (*Millipore*) y analizadas mediante SDS-PAGE y *Western blotting*. La concentración de proteína se determinó empleando el *Pierce BCA Protein Assay Kit* (*Thermo Scientific*).

7. Generación del anticuerpo policlonal anti-VP5 en conejo

Para obtener el anticuerpo policlonal frente a la proteína VP5 completa, se generó un suero hiperinmune en conejo en colaboración con la empresa de salud animal Hipra S.A., siguiendo el protocolo previamente descrito ([Harlow and Lane, 1988](#)). Se emplearon tres conejos New Zealand (*Oryctolagus cuniculus*) macho, de 3 meses de edad y con un peso aproximado de 2,5

kg. Cada conejo fue inmunizado mediante la inyección de 1 mg de antígeno (proteína FVP5 purificada en tampón PBS) en adyuvante de Freund completo para la primera inmunización e incompleto para las subsecuentes. Cada inoculación de antígeno fue repartida equitativamente en cuatro dosis intramusculares aplicadas en cada pata y en tres dosis subcutáneas en distintos lugares del lomo, siguiendo el método propuesto en la “*Guide for the care and use of laboratory animals*” del NIH. A los 20 y 40 días se volvieron a aplicar refuerzos de igual cantidad de antígeno. A los 60 días se sangraron los animales empleando tubos de ensayo sin anticoagulante. Para obtener el suero, la sangre se dejó coagular durante 30 min a RT, se centrifugo a 1.600xg durante 10 min a RT, se recogió el sobrenadante correspondiente al suero sanguíneo, se alicuoteó y congeló a -80°C. Los sueros de los distintos conejos inmunizados se analizaron mediante *Western blotting* e inmunofluorescencia para determinar su capacidad para detectar a la proteína VP5, lo que permitió seleccionar el suero más eficiente para la realización de los estudios subsiguientes.

8. Análisis por PCR cuantitativa (qPCR)

La purificación de los diferentes RNAs se realizó empleando el *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). La calidad de los RNAs aislados se determinó estimando el número de integridad de RNA (RIN) con un instrumento *2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies). Los RNAs fueron sometidos a transcripción inversa mediante incubación con transcriptasa inversa *Super Script III* (Invitrogen) en presencia de hexanucleótidos aleatorios de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Las muestras de DNA complementario (cDNA) fueron utilizadas para llevar a cabo las reacciones de qPCR usando los oligonucleótidos 5'-AAGGGCAGCTACGTCGATCTAC y 5'-TGGCAACTTCGTCTATGAA AGC, que hibridan en la región codificante de VP3 del segmento A de IBDV, dando lugar a la síntesis de un fragmento de DNA de 74 pb. Todas las reacciones fueron realizadas por triplicado empleando *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystem) en un instrumento *7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystem). Las reacciones fueron realizadas empleando el siguiente programa de amplificación: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 seg a 95°C, 1 min a 60°C, finalizando con 15 seg a 95°C, 1 min a 60°C, 30 seg a 95°C y 15 s a 60°C para construir la curva de fusión. Las cargas de RNA de IBDV fueron calculadas a partir de los valores de ciclo umbral (ct) mediante una regresión lineal usando una curva estándar.

9. SDS-PAGE, Western blotting y autoradiografía

Las muestras usadas para los análisis por *Western blotting* fueron preparadas mediante la eliminación del medio de monocapas celulares y resuspendiendo las células en tampón de lisis (20 mM Tris pH 7,5, 50 mM NaCl, 50 mM KCl, 0,5% Igepal, 1 mM EDTA, 10% glicerol) suplementado con inhibidores de proteasas (*cOmplete Mini EDTA-free*). Los lisados celulares fueron mezclados (v/v) con tampón de carga Laemmli 2x (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 0,5% azul de bromofenol, 10% glicerol, 10% β -mercaptoetanol) y mantenidos a 95°C durante 5 min. Las electroforesis fueron realizadas en 12% SDS-PAGE, seguido por electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa (*Bio-Rad*). Antes de la incubación con los anticuerpos específicos, las membranas fueron incubadas con tampón de bloqueo (PBS al 5% leche desnatada en polvo) durante 1 h a RT. Tras el bloqueo, las membranas fueron incubadas a 4°C durante 16 h con el correspondiente anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo. Los anticuerpos primarios empleados en este estudio fueron sueros policlonales de conejo específicos frente a las proteínas VP2 ([Fernandez-Arias et al., 1998](#)), VP5 (ver sección “*Generación del anticuerpo policlonal anti-VP5 en conejo*”) de IBDV, anticuerpos monoclonales de ratón (mAb) específicos frente a β -actina (*Sigma*) y un mAB de ratón específico contra el epítipo FLAG (*OriGene*). Tras la incubación con los anticuerpos primarios, las membranas fueron lavadas con PBS e incubadas 1 h a RT con el correspondiente anticuerpo secundario diluido en tampón de bloqueo. Los anticuerpos secundarios usados en este estudio fueron Ig de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa o Ig de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa (*Sigma*). En el caso del anticuerpo anti-VP5 de conejo, se incubó la membrana un anticuerpo secundario anti-ratón biotinilado (*Sigma*) durante 1 h a RT seguido por una incubación con estreptavidina conjugada a peroxidasa (*GE Healthcare*) durante 20 min a RT. Las bandas inmunoreactivas fueron detectadas mediante quimioluminiscencia empleando *ECL Plus Immunoblotting Detection Reagent* (*GE Healthcare*).

Para los marcajes metabólicos, las monocapas fueron lavadas dos veces con DMEM carente de metionina. A continuación, los cultivos fueron incubados durante 1 h con DMEM carente de metionina y posteriormente suplementado con 100 μ Ci/ml de [35 S]metionina durante 1 h. Tras este periodo, los cultivos fueron lavados dos veces con PBS, y resuspendidos en tampón de carga Laemmli. Las muestras de proteína fueron sometidas a 12% SDS-PAGE. Los geles fueron fijados, teñidos con azul de Coomassie para visualizar el patrón proteico, y posteriormente secados. La señal radiactiva fue detectada empleando un instrumento *Storm Gel Imaging System* (*Molecular Dynamics*).

10. Ensayo cuantitativo de muerte celular en tiempo real

Monocapas de células preconfluentes crecidas en placas de 24 pocillos fueron infectadas con el virus IBDV-WT o IBDV-VP5-KO o incubadas con medio de cultivo. Tras la absorción del virus, las monocapas fueron lavadas y cubiertas con medio suplementado con 2% FCS y el reactivo *IncuCyte Cytotox Green* (Essen Bioscience) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Las placas de cultivo fueron introducidas en un instrumento *IncuCyte ZOOM System* (Essen Bioscience). Los cultivos fueron monitorizados cada 30 min usando un objetivo 10x. Se monitorizaron cuatro zonas de la monocapa seleccionadas aleatoriamente en cada pocillo. Los datos fueron procesados empleando el programa *IncuCyte Zoom* (Essen Bioscience) para cuantificar la muerte celular. Los datos presentados corresponden a tres infecciones independientes que incluyen la cuantificación de datos correspondientes a un total de 12 videos por muestra analizada.

11. Análisis de inmunofluorescencia mediante microscopia confocal

Para la realización de ensayos de diseminación de virus célula-célula, se prepararon monocapas preconfluentes de células QM7 en placas μ -24 (*Ibidi*). Tras la infección, las monocapas fueron lavadas con PBS, cubiertas con medio semisólido compuesto por DMEM, 0,7% agar noble y 2% FCS, y mantenidas bajo condiciones normales de cultivo. A los tiempos p.i. indicados, el medio semisólido fue eliminado cuidadosamente, las monocapas fueron lavadas dos veces con PBS frío, fijadas con metanol/acetona (v/v) durante 5 min a -20°C, y secadas al aire. Las monocapas fijadas fueron lavadas dos veces con PBS y bloqueadas mediante incubación durante 30 min a RT con PBS suplementado con 3% FCS. Tras este periodo, las monocapas fueron incubadas con anticuerpo policlonal anti-VP2 de conejo ([Fernandez-Arias et al., 1998](#)) diluido en PBS suplementado con 3% FCS durante 90 min a RT. Tras un lavado intensivo con PBS, las monocapas fueron incubadas con mAb de ratón anti-Pan caderina (*Sigma*) durante 90 min a RT. Tras un lavado intensivo con PBS, las muestras fueron incubadas con anticuerpo IgG anti-conejo de cabra conjugado a *Alexa 488* (*Molecular Probes*) e IgG anti-ratón de cabra conjugado a *Alexa 594* (*Molecular Probes*) diluidos en PBS suplementado con 3% FCS durante 1 h a RT. Los núcleos celulares fueron teñidos con 2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-carboxamida (DAPI) (*Sigma*) diluido en PBS durante 30 min a RT. Finalmente, los pocillos de cultivo fueron cubiertos con PBS antes de su visualización.

Los estudios de localización subcelular fueron realizados empleando monocapas preconfluentes de células HeLa o QM7 preparadas sobre cubreobjetos de vidrio. A los tiempos p.i.

o post transfección indicados, los cubreobjetos fueron lavados dos veces con PBS frío. A continuación, las monocapas celulares fueron fijadas con metanol/acetona durante 5 min a -20°C y secadas al aire; y las monocapas transfectadas fueron fijadas con 4% paraformaldehído (*Sigma*) durante 30 min, permeabilizadas mediante la incubación con PBS conteniendo 0,5% Triton X-100 (*Sigma*) durante 5 min. Los cubreobjetos fijados fueron lavados dos veces con PBS, y bloqueados mediante incubación durante 20 min a RT con PBS suplementado con 5% FCS. Después de este periodo, las muestras fueron incubadas con un mAb anti-GFP (*Invitrogen*) de ratón, anti-FLAG (*OriGene*) de ratón o un anticuerpo policlonal anti-VP5 de conejo, diluidos en PBS suplementado con 1% FCS durante 1 h a 37°C. Tras un lavado intensivo con PBS, las muestras fueron incubadas con anticuerpo IgG anti-ratón de cabra conjugado a *Alexa 488* o IgG anti-conejo de cabra conjugado a *Alexa 488* diluidos en PBS suplementado con 1% FCS durante 1 h a 37°C. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI diluido en PBS durante 30 min a RT. Finalmente, los cubreobjetos fueron secados al aire, y montados con el reactivo anti decoloración *ProLong* (*Invitrogen*).

Las muestras fueron visualizadas mediante epifluorescencia usando un sistema de microscopia confocal *Leica TCS-Sp5* (*Leica Microsystems*). Las señales fluorescentes detectadas por microscopia confocal de escaneo laser (CLSM) fueron recogidas de manera independiente usando los filtros apropiados. Las imágenes fueron capturadas usando el paquete informático *LAS-AF v2.6.0* (*Leica Microsystems*).

El análisis de la distribución subcelular de la proteína VP5 fue realizado usando el programa Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>) sobre imágenes correspondientes a la sección confocal basal de células individuales teñidas tanto con anti-FLAG como con el suero anti-VP5. Las células con una señal específica de VP5 superior al 70% del total en cualquiera de los dos compartimentos analizados (PM y citoplasma) se catalogaron como pertenecientes al grupo con una distribución predominantemente membranal o citoplasmática. La fracción celular restante se catalogó como distribución mixta (PM/citoplasma). Los análisis estadísticos fueron realizados con datos correspondientes a tres experimentos independientes que incluían al menos 300 células por caso.

12. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Cultivos de células QM7 crecidos en discos de zafiro de 3 mm (*Engineering Office M. Wohlwend*) no infectados o infectados a MOI=3 con los virus IBDV-WT o IBDV-VP5-KO. A los tiempos p.i. indicados, los cultivos fueron mantenidos en solución de fijación (0,4 M HEPES pH 7,2,

2% glutaraldehído, 1% ácido tánico) durante 1 h a RT. Las muestras fueron entonces lavadas con 0,4 M HEPES pH 7,2, incubadas con solución de post-fijado (1% tetróxido de osmio y 0,8% ferricianuro de potasio diluido en agua destilada) durante 45 min a 4°C y procesadas para embeberlas en resina *EMbed 812* (*Electron Microscopy Sciences*) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Las secciones ultrafinas de las muestras fueron teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo saturados. Las micrografías fueron capturadas empleando un microscopio electrónico *1200 EX II* (*Jeol*) operando a 100 kV.

Para realizar los ensayos de inmuno-microscopia electrónica, cultivos de células QM7 fueron infectados con IBDV-WT a alta multiplicidad (MOI=3). A las 16 h p.i., los cultivos fueron mantenidos en solución de fijación (PBS, 4% paraformaldehído, 0,1% glutaraldehído) durante 4 h a 4°C. Tras la fijación, los sedimentos celulares fueron suspendidos en glicerol y congelados en etano líquido. Las muestras fueron transferidas a una unidad de congelación-sustitución *Riechert-Jung AFS* (*Leika*) y mantenidas a 90°C en una mezcla (p/v) de metanol y acetato de uranilo durante 48 h. A continuación, las muestras fueron infiltradas en *Lowicryl KYM* (*EML laboratories*) a 30°C. La polimerización fue inducida con luz UV. Secciones ultrafinas de las muestras fueron inmunomarcadas con suero anti-VP2 seguido por incubación con IgG de cabra anti-conejo conjugado a oro coloidal de 5 nm. Las micrografías fueron capturadas con un microscopio electrónico *1200 EX II* (*Jeol*) operando a 100 kV.

13. Ensayos de unión a lípidos

Para la realización de estos ensayos, se emplearon matrices de lípidos (*lipid arrays*) depositados sobre membranas hidrofóbicas (*Echelon Biosciences*). Al inicio de los ensayos, las matrices fueron bloqueadas en tampón de bloqueo BBF (PBS suplementado con 5% BSA libre de lípidos, 0,1% Tween-20, 3 mM CaCl₂) durante 90 min a RT. Tras este periodo, las matrices fueron incubadas durante 90 min a RT con la proteína bajo estudio, diluida en BBF a una concentración de 5 µg/ml. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con BBF e incubadas con el mAAb anti-FLAG de ratón durante 60 min a RT. A continuación, las membranas fueron lavadas con BBF e incubadas con anticuerpo IgG anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa durante 60 min a RT. Finalmente, tras un nuevo proceso de lavado, la proteína unida a la matriz fue detectada mediante quimioluminiscencia empleando *ECL Plus Immunoblotting Detection Reagent*.

14. Análisis estadístico

Se empleó el programa *Graphpad Prism* para determinar la significación estadística de los datos numéricos obtenidos, mediante una prueba T de Student de dos colas para muestras independientes.

Resultados

1. CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA VP5 EN EL CICLO REPLICATIVO VIRAL

1.1. Análisis del patrón de expresión temporal de la proteína VP5 en células infectadas por IBDV

Como se ha mencionado anteriormente, al comienzo de este trabajo se carecía de datos experimentales acerca de la regulación temporal de la expresión de la proteína VP5, una información fundamental para analizar el papel funcional de esta proteína durante el ciclo de replicación viral. Por ello, nuestro trabajo experimental se centró inicialmente en la realización de un análisis comparativo de la cinética de acumulación de la proteína VP5 en cultivos infectados por IBDV. Como control para estos experimentos, se analizó de forma paralela la cinética de acumulación de la proteína VP3, un polipéptido estructural cuya expresión ya había sido caracterizada exhaustivamente con anterioridad.

Los experimentos se realizaron infectando monocapas preconfluentes de células QM7 con los virus IBDV-WT o con el mutante de IBDV que no expresa la proteína VP5, denominado IBDV-VP5-KO. Los cultivos fueron infectados a alta multiplicidad (MOI=3). Como control, se emplearon cultivos de células QM7 sin infectar. Los cultivos fueron recogidos a diferentes tiempos p.i., abarcando un periodo de 24 h. Los extractos celulares correspondientes fueron analizados mediante *Western blotting* usando anticuerpos específicos frente a las proteínas VP5 y VP3. Como control de carga de proteína, las muestras fueron analizadas mediante *Western blotting* empleando un suero específico frente a la proteína celular actina. Estos experimentos fueron realizados por triplicado, obteniéndose resultados similares en todos los casos. La **Figura 10** muestra un ejemplo representativo de los resultados obtenidos.

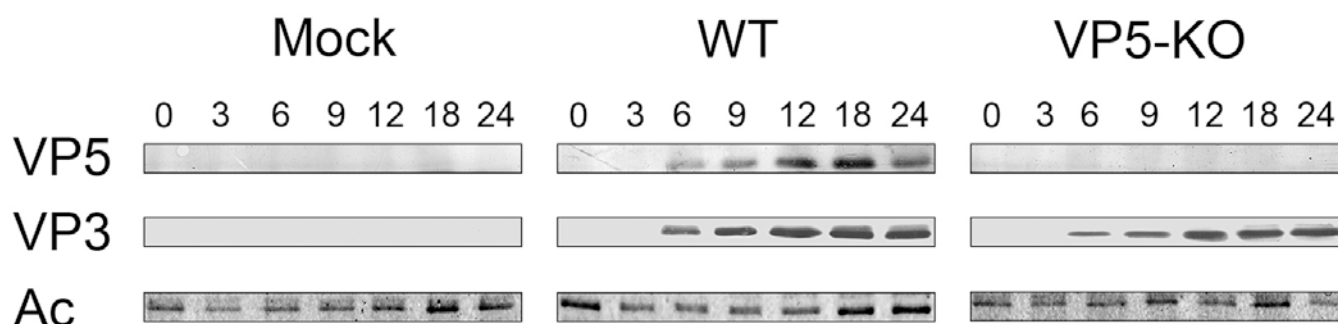


Figura 10. Análisis de la expresión temporal de la proteína VP5 en células infectadas por IBDV. Cultivos de células QM7 no infectadas (Mock) o infectadas (MOI=3) con los virus IBDV-WT o IBDV-VP5-KO. Los extractos celulares recogidos a diferentes tiempos p.i. (0, 3, 6, 9, 12, 18 y 24 h) fueron sometidos a SDS-PAGE seguido de análisis por Western blotting usando sueros anti-VP5, VP3 o actina.

El *Western blotting* realizado con el suero anti-VP5 reveló la presencia de una banda inmunoreactiva con una migración correspondiente a una proteína de ≈ 19 kDa en las muestras de células infectadas con IBDV-WT. Como era de esperar, esta banda no fue detectada en extractos de células infectadas con el virus IBDV-VP5-KO ni en cultivos sin infectar. Por otra parte, se puede apreciar que la intensidad de esta banda aumenta gradualmente a lo largo del tiempo p.i., siguiendo un patrón de acumulación similar al observado con la proteína viral control VP3. Estos resultados evidencian que la expresión de la proteína VP5 se mantiene a lo largo del ciclo de replicación del virus siguiendo una cinética de expresión temporal similar al de la proteína VP3.

1.2. Determinación del papel funcional de VP5 en el proceso de transcripción/replicación de IBDV

Una vez establecido el patrón de expresión temporal de la proteína, el trabajo se centró en el análisis del posible efecto de la eliminación de la proteína VP5 sobre aspectos fundamentales del programa replicativo del virus, tales como la transcripción/replicación del genoma viral, la traducción de proteínas virales y el tamaño de la progenie.

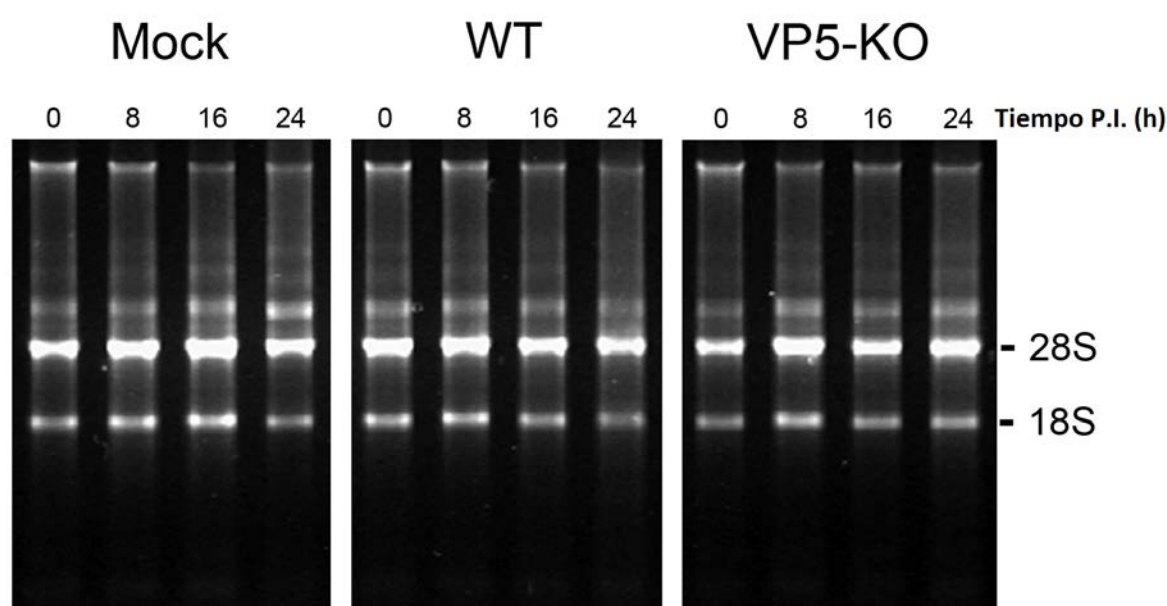


Figura 11. Efecto de la eliminación de la proteína VP5 sobre la acumulación de RNA total. Cultivos de células QM7 sin infectar (Mock) o infectadas (MOI=3) con los virus IBDV-WT o IBDV-VP5-KO. A los tiempos p.i. indicados (0 h, 8 h, 16 h y 24 h), los cultivos fueron recogidos y procesados para aislar su RNA total. Los RNAs aislados fueron sometidos a electroforesis en gel de Tris-borato-EDTA en geles de agarosa. Los geles fueron teñidos con SYBR Safe (ThermoFisher Scientific). Se indican las posiciones correspondientes a los RNAs ribosómicos 28S y 18S.

En primer lugar se analizó la cinética de acumulación de RNA viral en células QM7 infectadas a alta multiplicidad (MOI=3) con los virus IBDV-WT e IBDV-VP5-KO. Como control se emplearon cultivos no infectados. A los tiempos p.i. indicados (0, 8, 16 y 24 h), los cultivos fueron recogidos y empleados para aislar RNA total. Tras el proceso de purificación se procedió a analizar

el estado de las diferentes muestras de RNAs. Mediante la determinación del número de integridad del RNA (RIN) (Schroeder et al., 2006), siendo éste en todos los casos superior a 9 en una escala 1-10 (datos no mostrados). Estos valores, indicativos de un excelente nivel de integridad fueron confirmados mediante electroforesis en geles de agarosa (Figura 11). Como se observa en la figura, los RNAs aislados de cultivos infectados con IBDV-WT e IBDV-VP5-KO presentan un nivel de integridad similar a la de las muestras correspondientes a cultivos no infectados, incluso a 24 h p.i., cuando las células muestran un acusado efecto citopático. Estos resultados indican que la replicación viral no provoca la degradación del RNA ribosomal. Por otra parte, de acuerdo a estos resultados, la expresión de la proteína VP5 no parece estar relacionada con la posible inducción de procesos de muerte celular provocada por la infección. Como se describe más adelante, se realizaron experimentos más pormenorizados para caracterizar este punto.

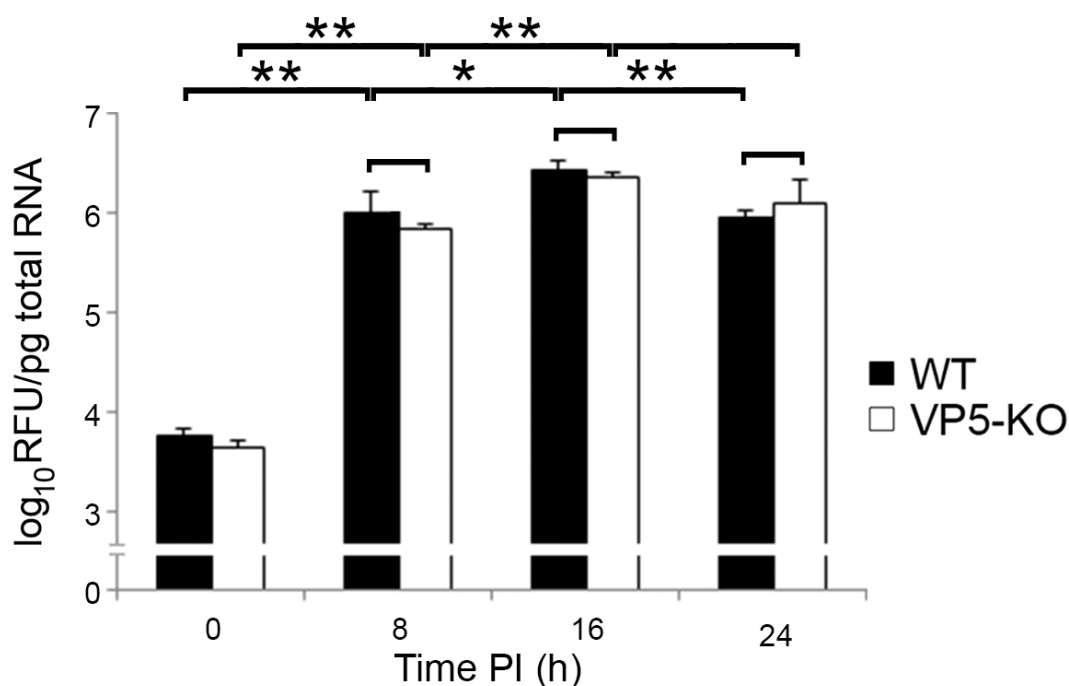


Figura 12. Efecto de la expresión de la proteína VP5 sobre el proceso de transcripción/replicación del genoma de IBDV. Cultivos de células QM7 no infectadas (Mock) o infectadas (MOI=3) con los virus IBDV-WT o IBDV-VP5-KO fueron recogidos a los tiempos p.i. indicados (0, 8, 16 y 24 h). Las muestras fueron empleadas para aislar RNA total. Los RNAs aislados fueron analizados mediante qPCR empleando oligonucleótidos que hibridan en la región codificante del segmento genómico A. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado. Los datos presentados se corresponden a la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. Las barras negras y blancas corresponden a los datos correspondientes a cultivos infectados con el virus WT y VP5-KO, respectivamente. Los corchetes indican comparación de datos por parejas mediante una prueba T de Student de dos colas para muestras independientes. * $p < 0.01$. ** $p < 0.001$.

Las muestras de RNA aisladas fueron empleadas para determinar mediante qPCR la cinética de acumulación de RNA viral. Para ello, se empleó una pareja de oligonucleótidos que hibridan en

la región codificante de la proteína VP3 del segmento A del genoma de IBDV. Los datos presentados en la **Figura 12**, corresponden a tres experimentos independientes. Como se observa en la gráfica, la cinética de acumulación de RNA viral es similar en ambas infecciones. El análisis estadístico de los datos obtenidos no reveló diferencias significativas en los niveles de acumulación de RNA viral entre las infecciones realizadas con IBDV-WT e IBDV-VP5-KO en ninguno de los tiempos p.i. analizados. Como se evidencia en la gráfica, la máxima acumulación de RNA viral se alcanza a las 16 h p.i., decreciendo ligeramente a las 24 h p.i. Esta reducción en el nivel de acumulación de RNA entre las 16 y las 24 h p.i. fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$) únicamente en el caso de infecciones con el virus IBDV-WT. Este resultado permite afirmar que la expresión de la proteína VP5 no afecta de forma significativa al metabolismo del RNA viral.

1.3. Determinación del papel de VP5 en el proceso de traducción de proteínas de IBDV

Con el fin de analizar el efecto de la proteína VP5 sobre la síntesis del resto de proteínas codificadas por el virus, cultivos de células QM7 infectados a alta multiplicidad ($MOI=3$) con IBDV-WT, IBDV-VP5-KO fueron marcados metabólicamente durante 1 h con [35 S]metionina a distintos tiempos p.i. Como control, se emplearon cultivos no infectados. Los extractos celulares correspondientes fueron sometidos a SDS-PAGE. Tras la electroforesis, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie para evaluar la carga proteica de las diferentes muestras empleando la banda correspondiente a actina (42 kDa) y posteriormente revelados mediante autorradiografía. La **Figura 13** muestra imágenes representativas de los resultados obtenidos en tres experimentos independientes.

Como se observa en la figura, la síntesis *de novo* de proteínas codificadas por IBDV (VP1 a VP4) comienza a ser detectable a partir de las 6 h p.i. En ambas infecciones, el máximo nivel de expresión de proteínas virales se detecta en el periodo comprendido entre las 9 y 18 h p.i., para posteriormente disminuir bruscamente a las 24 h p.i. Teniendo en cuenta los datos de carga de proteína total aportados por el control de actina, se puede interpretar que esta caída en la síntesis proteica refleja el agotamiento de la maquinaria traduccional, probablemente asociado al inicio del proceso de muerte celular provocado por la infección que, como se describirá más adelante, comienza a detectarse entre las 18 y 24 h p.i. El análisis comparativo de los autorradiogramas obtenidos indica la inexistencia de diferencias significativas tanto en la cinética como en el nivel de expresión de proteínas virales en cultivos infectados por los dos virus bajo estudio. Estos resultados indican que la proteína VP5 no juega un papel reseñable en el control de la expresión del resto de proteínas codificadas por el genoma viral. Es importante indicar que la proteína VP5

contiene un único residuo de metionina, lo que dificulta su detección mediante esta aproximación experimental. Por otra parte, los resultados obtenidos indican que la infección con IBDV no provoca una inhibición (*shut-off*) significativa de la traducción de proteínas celulares.

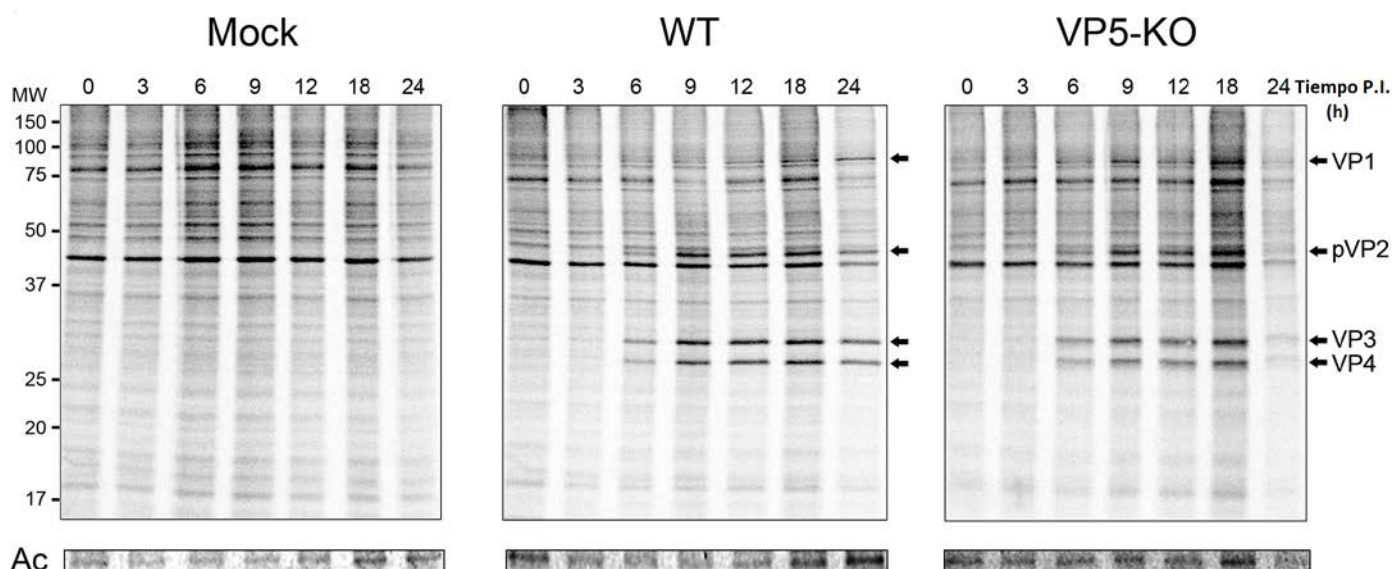


Figura 13. Efecto de la expresión de la proteína VP5 sobre el proceso de síntesis de proteínas virales. Cultivos de células QM7 sin infectar (Mock) o infectadas (MOI=3) con los virus IBDV-WT o IBDV-VP5-KO fueron marcados metabólicamente con [35 S]metionina durante 1 h a los tiempos p.i. indicados (0 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 18 h y 24 h). Las muestras fueron recogidas y los extractos correspondientes fueron sometidos a SDS-PAGE. Tras teñirse con azul de Coomassie, los geles fueron desecados y analizados mediante autorradiografía. Los experimentos se realizaron por triplicado. En la figura se muestran autorradiogramas representativos de los resultados obtenidos. Se indican las posiciones de los marcadores de peso molecular (MW). La posición de las proteínas virales (VP1-VP4) está indicada con flechas. El panel inferior corresponde a la proteína actina (Ac) de 42 kDa, detectada mediante tinción con azul de Coomassie.

1.4. Determinación del papel de VP5 en el proceso de ensamblaje de la progenie de IBDV

Con el fin de evaluar el posible papel de la proteína VP5 durante el proceso de ensamblaje de la progenie viral, se infectaron cultivos de células QM7 con los virus IBDV-WT e IBDV-VP5-KO a alta multiplicidad (MOI=3). Como control se emplearon cultivos no infectados. Los cultivos fueron recogidos a distintos tiempo p.i. (8, 16 y 24 h) y posteriormente procesados para su visualización mediante TEM. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 14**.

Como se observa en las imágenes correspondientes a las 8 h p.i., ya en esta fase temprana de la infección se detecta la presencia de factorías virales conteniendo nuevas partículas ensambladas formando matrices paracristalinas de virus (PVA) en forma de panal de abeja. Este fenómeno sucede por igual en las células infectadas con ambos virus bajo estudio. Como era esperable, no se detectó la presencia de viriones de IBDV en muestras no infectadas (datos no

mostrados). Tanto la abundancia como el tamaño de los PVAs vistos en las infecciones con los virus IBDV-WT e IBDV-VP5-KO se ve incrementado a tiempos p.i. tardíos (16 y 24 h) (**Figura 22**).

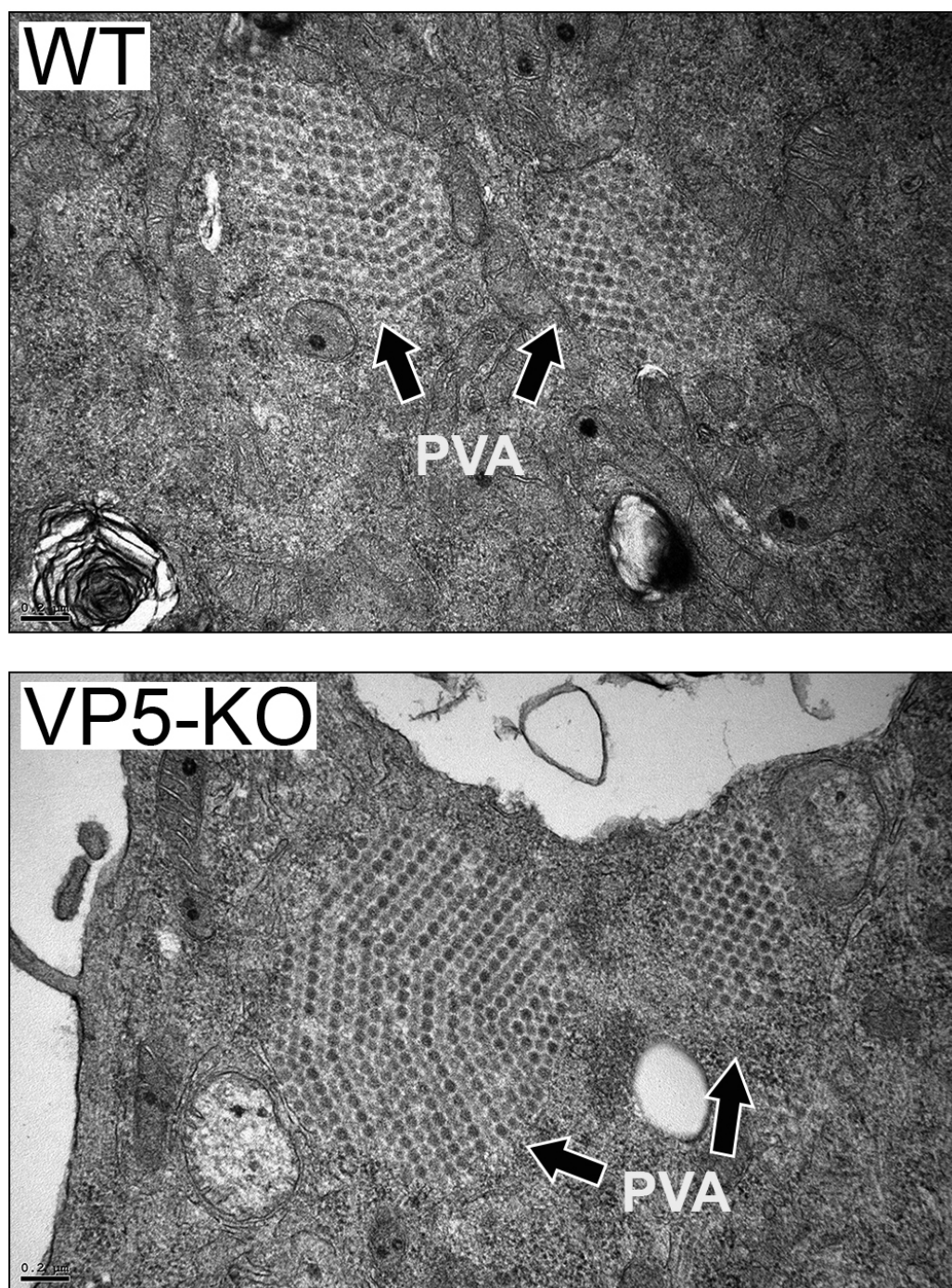


Figura 14. Efecto de la expresión de la proteína VP5 sobre el ensamblaje de IBDV. Micrografías de muestras correspondientes a células QM7 infectadas con los virus IBDV-WT e IBDV-VP5-KO, respectivamente. Las muestras fueron fijadas a las 8 h p.i. y posteriormente visualizadas mediante microscopía electrónica de transmisión. Las flechas indican la posición de acumulaciones paracristalinas de IBDV. Las barras corresponden a 0,2 μm.

Para determinar de forma inequívoca que los PVAs observados se corresponden a factorías virales, las muestras se analizaron mediante inmuno-microscopía electrónica empleando un suero anti-VP2 seguido por una incubación con un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado a

oro coloidal (**Figura 15**). Como se observa en la imagen, los PVAs fueron específicamente reconocidos por el suero anti-VP2, confirmando de esta forma el origen viral de estas estructuras.

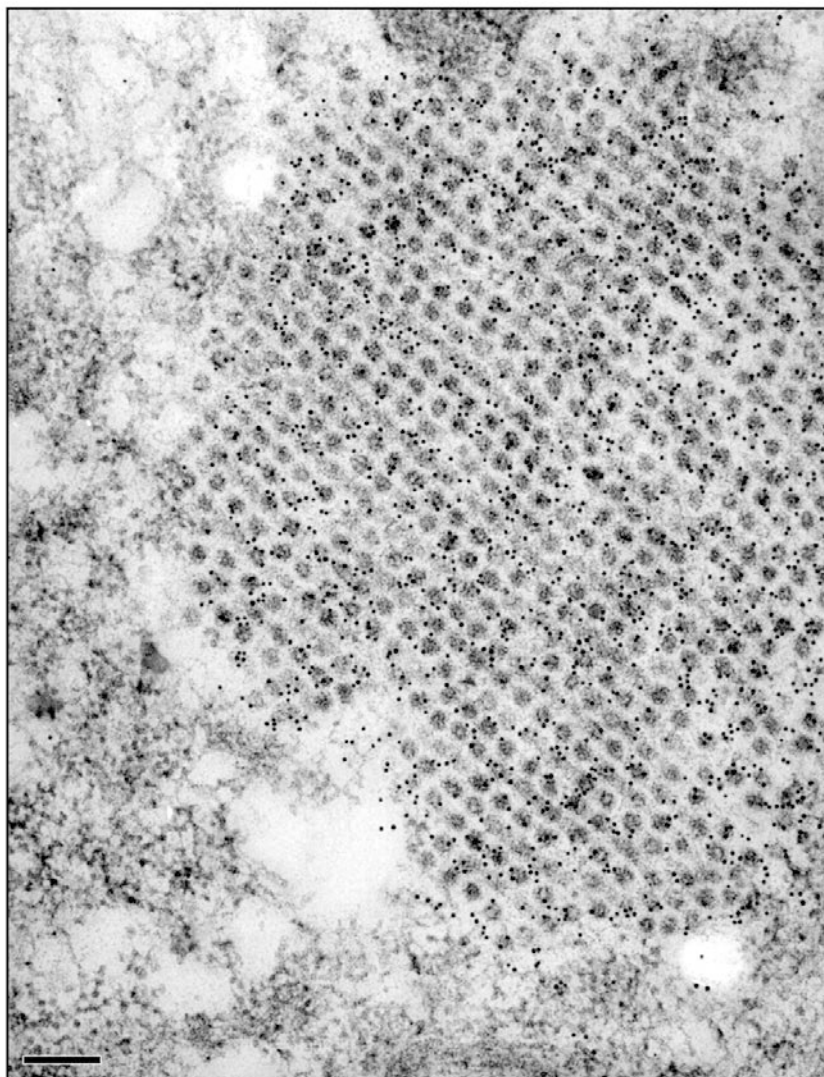


Figura 15. Identificación de viriones de IBDV mediante inmuno-microscopía electrónica. Cultivos de células QM7 fueron infectadas a alta multiplicidad (MOI=3) con IBDV-WT. A las 16 h p.i. las células fueron procesadas para inmuno-microscopía electrónica. Secciones ultrafinas de las muestras fueron inmunomarcadas con suero anti-VP2 seguido por incubación con IgG de cabra anti-conejo conjugado a oro coloidal de 5 nm. Las micrografías muestran un detalle del citoplasma de una célula infectada que porta una acumulación paracristalina formada por viriones de IBDV reconocido específicamente por el suero anti-VP2. Las barras corresponden a 0,2 μ m.

Tomados en conjunto, los resultados presentados indican que la ausencia de la proteína VP5 no afecta al ensamblaje de la progenie viral.

1.5. Determinación del papel de VP5 en la cinética de muerte celular provocada por la infección por IBDV

Estudios anteriores de nuestro laboratorio mostraron que la sobreexpresión de la proteína VP5 empleando vectores recombinantes provoca una importante desregulación de la homeostasis

celular que eventualmente provoca lisis celular (Lombardo et al., 2000). Por otra parte, estudios publicados por diferentes laboratorios sugieren una posible implicación de esta proteína tanto en el control como en la inducción de respuesta apoptótica causada por la infección por IBDV (Yao et al., 1998, Liu and Vakharia, 2006, Wei et al., 2011, Li et al., 2012, Lin et al., 2015).

Con el fin de establecer de forma inequívoca el posible papel de la proteína VP5 sobre el control o inducción de la respuesta apoptótica, se realizó un estudio comparativo para determinar en tiempo real las tasas de muerte celular inducidas tras la infección con los virus IBDV-WT e IBDV-VP5-KO, respectivamente. Para ello, se infectaron monocapas preconfluentes de células QM7 a alta multiplicidad (MOI=3) con los virus bajo estudio. Como control, se emplearon cultivos no infectados. Tras la infección, los cultivos fueron incubados en medio fresco suplementado con la sonda fluorescente *IncuCyte Cytotox Green*. Esta sonda, que accede de forma exclusiva al interior de células cuya PM se encuentra deteriorada, se une de forma específica al DNA. Esta propiedad permite la identificación inequívoca de células inviables. Los cultivos fueron monitorizados cada 30 min durante el periodo comprendido entre las 0 y las 48 h p.i., empleando un instrumento *IncuCyte ZOOM live cell imaging system*. Los experimentos fueron realizados por triplicado de forma independiente, obteniéndose datos prácticamente idénticos en todos los casos.

Como se muestra en la **Figura 16A**, correspondiente a uno de los análisis realizados, las tasas de muerte celular detectadas en cultivos celulares infectados con los virus IBDV-WT e IBDV-VP5-KO hasta las 16 h p.i. fueron relativamente bajas e indistinguibles entre sí, llegando en ambos casos a niveles cercanos al 10% de las células infectadas. Desde las 16 a las 30 h p.i., las tasas de muerte detectadas en ambos cultivos aumentan progresivamente hasta alcanzar aproximadamente el 45%, siendo en las células infectadas por IBDV-VP5-KO ligera, aunque significativamente ($p<0,01$), más elevadas que en las células infectadas con el virus IBDV-WT. Tras este periodo y hasta las 48 h p.i., las tasas de muerte celular se aproximan en ambas infecciones, alcanzando valores 60% aproximadamente. Como era de esperar, las tasas de muerte celular en los cultivos no infectados fueron ostensiblemente más bajas, alcanzando valores del 10% a las 48 h.

En la **Figura 16B** se muestran imágenes representativas del estado de los diferentes cultivos correspondientes a las 48 h p.i. El conjunto de todos estos experimentos descarta un posible papel directo de la proteína VP5 en el control o inducción de apoptosis durante la infección por IBDV.

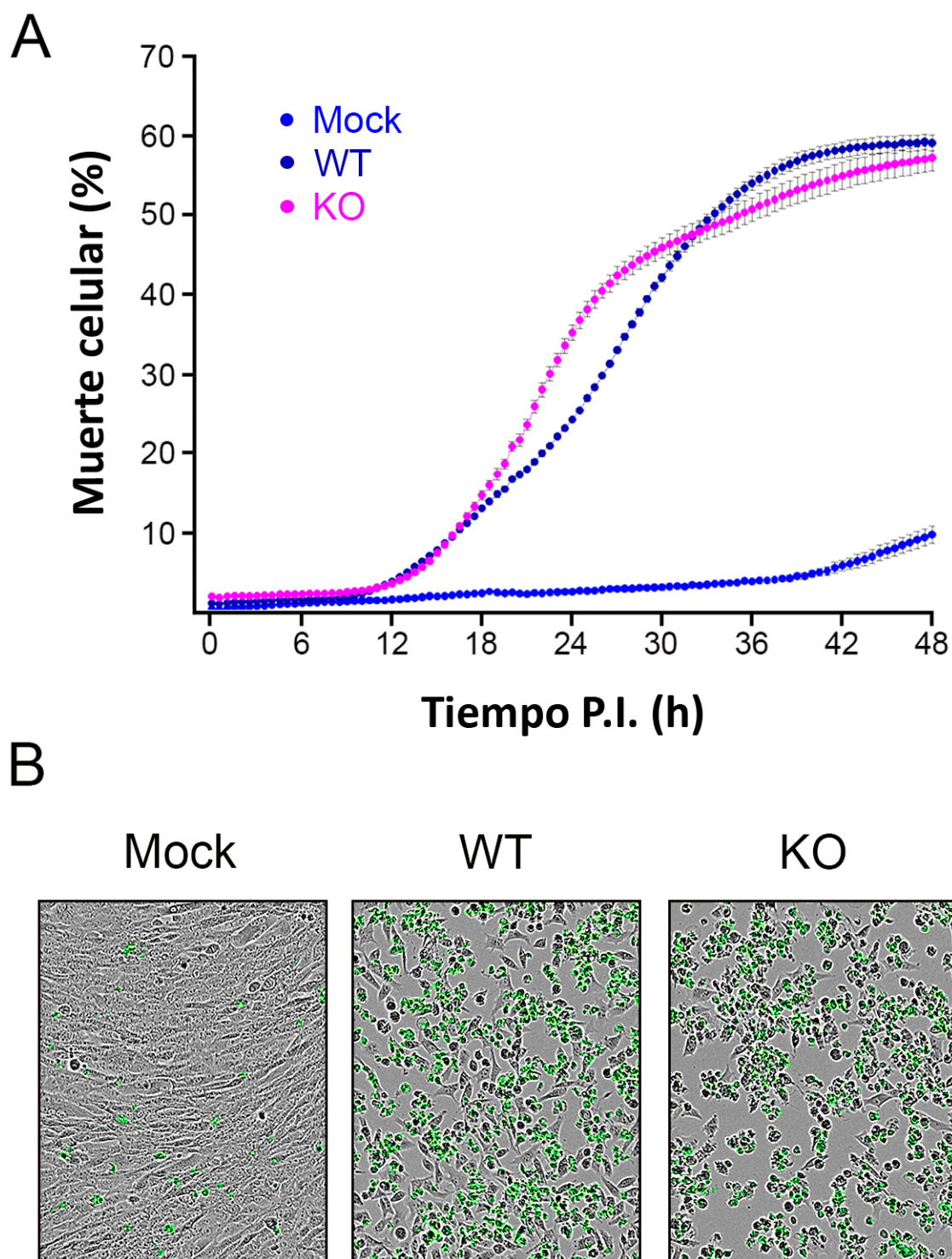


Figura 16. Efecto de la expresión de la proteína VP5 sobre la inducción de muerte celular. Cultivos de células QM7 no infectadas (Mock) o infectadas a alta multiplicidad (MOI=3) con los virus IBDV-WT o IBDV-VP5-KO fueron mantenidos durante 48 h en medio de cultivo suplementado con la sonda fluorescente IncuCyte Cytotox Green. **A)** Cuantificación de la muerte celular. Los cultivos fueron monitorizados cada 30 min empleando un aparato IncuCyte ZOOM live cell imaging system. Para la realización del análisis, se monitorizaron cuatro zonas seleccionadas aleatoriamente en cada pocillo. Los datos recogidos, fueron analizados de forma automática con el programa IncuCyte Zoom. Los datos presentados corresponden a tres infecciones independientes, lo que implica la cuantificación de datos correspondientes a un total de 12 videos recogidos por muestra. **B)** Imágenes representativas capturadas a 48 h p.i. Se muestra una superposición de imágenes correspondientes a microscopía de contraste de fase y fluorescencia. La señal verde corresponde a núcleos marcados fluorescentemente en células inviables.

1.6. Determinación del papel de VP5 sobre el tamaño de la progenie infectiva de IBDV

Como se ha citado anteriormente, diversos estudios indican la existencia de una posible relación entre la expresión de la proteína VP5 y el incremento del título de virus extracelular (Mundt et al., 1997, Wu et al., 2009). Por ello, nuestro siguiente paso consistió en realizar una evaluación comparativa de las curvas de crecimiento, intra- y extracelular, de los virus IBDV-WT e IBDV-VP5-KO.

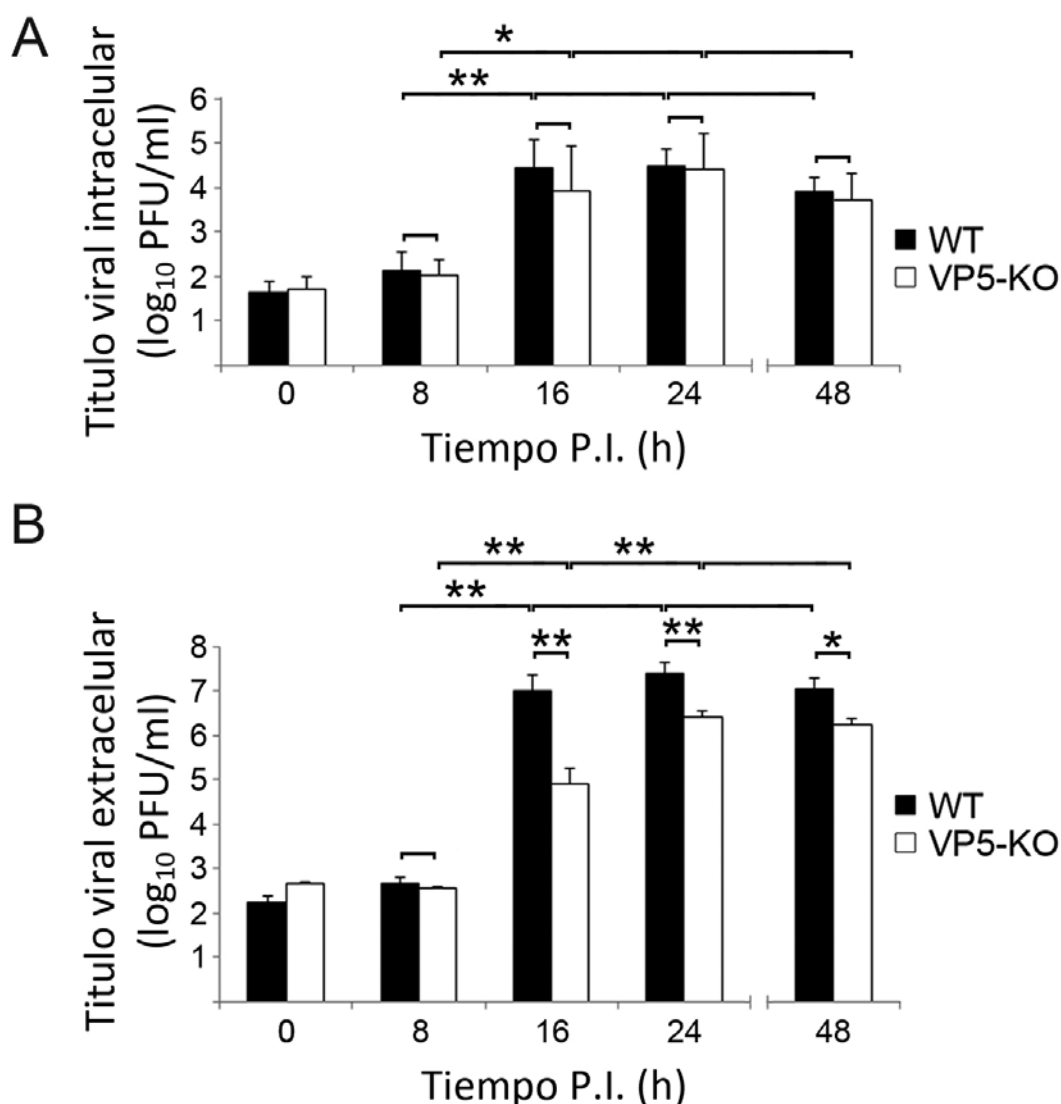


Figura 17. Efecto de la expresión de la proteína VP5 sobre el rendimiento de progenie viral durante un único ciclo infectivo por IBDV. Cultivos de células QM7 fueron infectadas a alta multiplicidad ($\text{MOI}=3$) con los virus IBDV-WT e IBDV-VP5-KO. Las muestras correspondientes a virus intra- y extracelular fueron recogidas a los tiempos p.i. indicados (0h, 8h, 16h, 24h y 48 h). Las barras negras y blancas corresponden a los cultivos infectados con IBDV-WT e IBDV-VP5-KO, respectivamente. Los datos presentados corresponden a la media \pm desviación estándar de los títulos virales correspondientes a tres experimentos independientes. Las titulaciones fueron llevadas a cabo por triplicado. Los corchetes indican comparación de datos por parejas determinadas por una prueba T de Student de dos colas para muestras independientes. * $p<0.01$ y ** $p<0.001$. A) Titulo viral intracelular. B) Titulo viral extracelular.

En primer lugar, se determinó la producción de progenie viral infectiva en condiciones de un único ciclo de replicación (*one step replication*). Para ello, monocapas preconfluentes de células QM7 fueron infectadas a alta multiplicidad ($\text{MOI}=3$) con los virus IBDV-WT e IBDV-VP5-KO, respectivamente. Las muestras fueron recogidas a diferentes tiempos p.i. (0, 8, 16, 24 y 48 h) y empleadas para la realización de titulaciones mediante inmunotinción. Las titulaciones fueron realizadas por triplicado a partir de muestras correspondientes a tres experimentos independientes.

Como se muestra en la **Figura 17A**, la acumulación de virus intracelular alcanza su máximo entre las 16 y 24 h p.i., decayendo a partir de las 24 h p.i. No se detectaron diferencias significativas entre las cinéticas de acumulación de virus intracelular en cultivos infectados por los virus IBDV-WT e IBDV-VP5-KO, siendo prácticamente idénticas para ambos virus en todos los tiempos analizados. Sin embargo, este estudio reveló la existencia de diferencias significativas en los títulos de virus extracelular en cultivos infectados con ambos virus (**Figura 17B**). Mientras los títulos de virus extracelular detectados en cultivos infectados por el virus IBDV-WT alcanzan su máximo a las 16 h p.i. y se mantienen estables hasta las 48 h p.i., en cultivos infectados por el virus IBDV-KO se alcanzan seis horas más tarde, a las 24 h. Por otra parte, los títulos extracelulares detectados en cultivos celulares infectados con el virus IBDV-WT fueron significativamente más elevados ($>2 \log_{10}$ unidades a 16 h p.i., y aproximadamente $1 \log_{10}$ unidades a 24 y 48 h p.i.) que los detectados en células infectadas con IBDV-VP5-KO.

A continuación, se realizó un análisis de las curvas de crecimiento de ambos virus bajo condiciones de varios ciclos de replicación (*multiple step replication*). Para ello, los cultivos fueron infectadas a baja multiplicidad ($\text{MOI}=0,05$). En este caso, las muestras fueron recogidas a 24, 48, 72 y 96 h p.i., determinándose únicamente el título de virus extracelular. Como en el experimento anterior, las titulaciones fueron realizadas por triplicado a partir de tres experimentos independientes. Como se muestra en la **Figura 18**, ambos virus muestran una cinética de crecimiento sustancialmente diferente. Mientras los máximos títulos virales obtenidos en cultivos infectados con el virus IBDV-WT se registran a las 48 h p.i., manteniéndose constantes hasta las 96 h p.i., los títulos más altos obtenidos por IBDV-VP5-KO se alcanzan a las 72 h p.i., manteniéndose, también en este caso, constantes hasta las 96 h p.i. Por lo tanto, se observa un retraso de aproximadamente 24 h en la aparición del máximo título viral en las células infectadas con el virus IBDV-VP5-KO con respecto de las células infectadas con el virus IBDV-WT. En concordancia con los datos correspondientes a la infección en un único ciclo (**Figura 17**), la infección con IBDV-WT

resulta en un incremento significativo en la producción de virus (aproximadamente 2 log₁₀ unidades a 24 h y 48 h p.i., y ≈1 log₁₀ unidades a 72 h y 96 h p.i.) con respecto a los detectados en cultivos infectados con el virus carente de la proteína VP5, IBDV-VP5-KO.

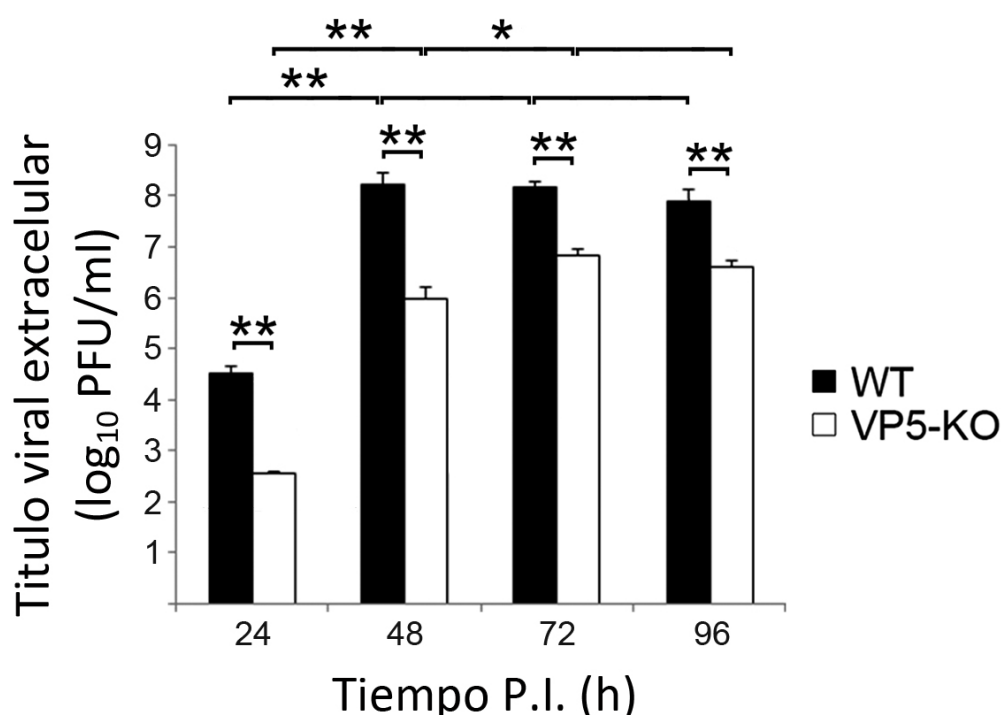


Figura 18. Efecto de la expresión de la proteína VP5 en el rendimiento de progenie viral durante varias rondas de replicación viral. Cultivos de células QM7 fueron infectados a baja multiplicidad (MOI=0,05) con los virus IBDV-WT e IBDV-VP5-KO. Las muestras fueron recogidas a los tiempos p.i. indicados (24 h, 48 h, 72 h y 96 h). Las barras negras y blancas corresponden a los cultivos infectados con IBDV-WT e IBDV-VP5-KO, respectivamente. Los datos presentados corresponden a la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes. Las titulaciones fueron llevadas a cabo por triplicado. Los corchetes indican comparación de datos por parejas determinadas por una prueba T de Student de dos colas para muestras independientes. * $p < 0.01$ y ** $p < 0.001$.

Tomados en conjunto, los resultados experimentales descritos hasta el momento muestran que el virus IBDV-VP5-KO presenta un defecto específico que provoca una reducción significativa en la producción de virus extracelular, lo que sugiere que la proteína VP5 juega un papel clave en el proceso de liberación de la progenie de IBDV.

1.7. Determinación del papel de VP5 en la diseminación de IBDV

Los resultados descritos anteriormente sugerían fuertemente la posibilidad de que la proteína VP5 podría jugar un papel relevante en la diseminación del virus. Para analizar esta hipótesis se decidió caracterizar la capacidad de diseminación célula a célula del virus mediante la comparación del tamaño de las placas de lisis producidas por los virus IBDV-WT e IBDV-VP5-KO. Para ello, cultivos preconfluentes (50% de confluencia) de células QM7 fueron infectados con diluciones seriadas de preparaciones de ambos virus. Tras la infección, las monocapas fueron

lavadas dos veces con PBS y recubiertas con medio DMEM semisólido, suplementado con 0,7% agarosa y 2% FCS. A las 72 h p.i. el medio fue cuidadosamente eliminado, y las monocapas procesadas para inmunotinción empleando un antisuero específico frente a la proteína VP2 de la cápsida de IBDV.

Como se muestra en la **Figura 19**, el tamaño medio de las placas de lisis producidas por el virus IBDV-VP5-KO es significativamente inferior (aproximadamente 14 veces, ver **Figura 33B**) que las desarrolladas en los cultivos infectados con el virus IBDV-WT. Este hecho demuestra que la ausencia de la proteína VP5 provoca una drástica reducción del tamaño de placa del virus, confirmando por tanto la hipótesis de partida.

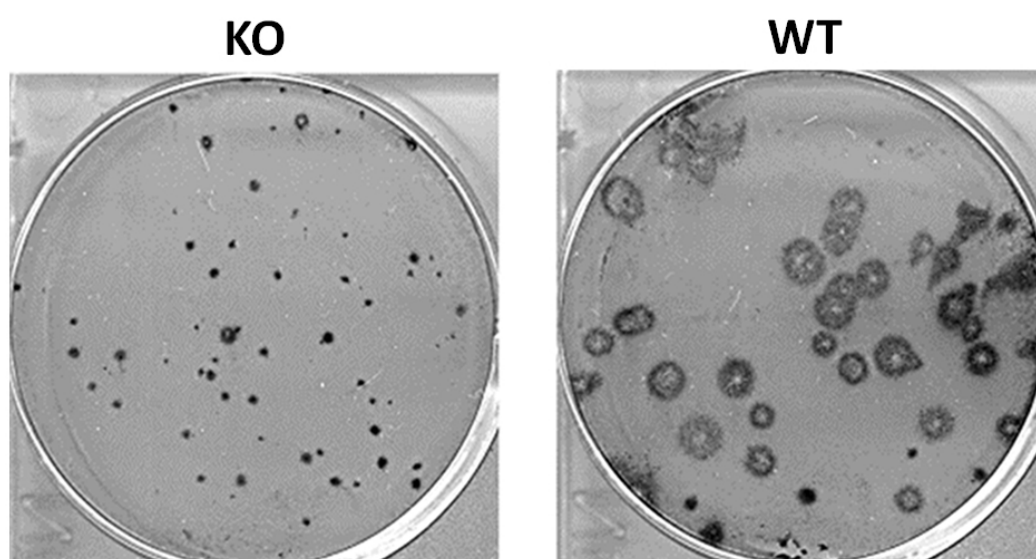


Figura 19. Efecto de la expresión de la proteína VP5 sobre el tamaño de placa de lisis de IBDV. Monocapas de células QM7 fueron infectadas con IBDV-WT o IBDV-VP5-KO, respectivamente. Tras la infección, las monocapas fueron cubiertas con medio semisólido. A las 72 h p.i., el medio fue eliminado y las placas de lisis producidas por el virus fueron detectadas mediante inmunotinción usando un suero anti-VP2, la proteína de la cápsida de IBDV.

1.8. Determinación del papel de VP5 en la capacidad de diseminación de IBDV al nivel de célula individual

Los datos descritos anteriormente sugerían la necesidad de estudiar con mayor profundidad tanto el fenómeno de diseminación viral como la implicación de la proteína VP5 en este proceso. Para ello, se decidió intentar visualizar el proceso de liberación de partículas infectivas de IBDV con el mayor detalle posible, caracterizándolo a nivel de célula individual.

A tal fin, monocapas preconfluentes de células QM7 fueron infectadas a baja multiplicidad ($\text{MOI}=0,005$) con los virus IBDV-WT e IBDV-VP5-KO, respectivamente. Tras el periodo de adsorción, los cultivos fueron lavados con medio fresco y cubiertos con medio semisólido para ralentizar la

difusión de las partículas virales liberadas al medio extracelular. A diferentes tiempos p.i. (8, 12, 16, 20, 24, 32, 40 y 48 h), el medio semisólido fue eliminado y los cultivos fueron fijados y posteriormente procesados para inmunofluorescencia empleando un antisuero específico frente a la proteína VP2. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. Las muestras fueron visualizadas mediante CLSM. Los resultados de este estudio se presentan en la **Figura 20**, que contiene un conjunto representativo de imágenes correspondientes a ambas infecciones obtenidas a los diferentes tiempos clave (8, 16 y 24 h p.i.) para el análisis.

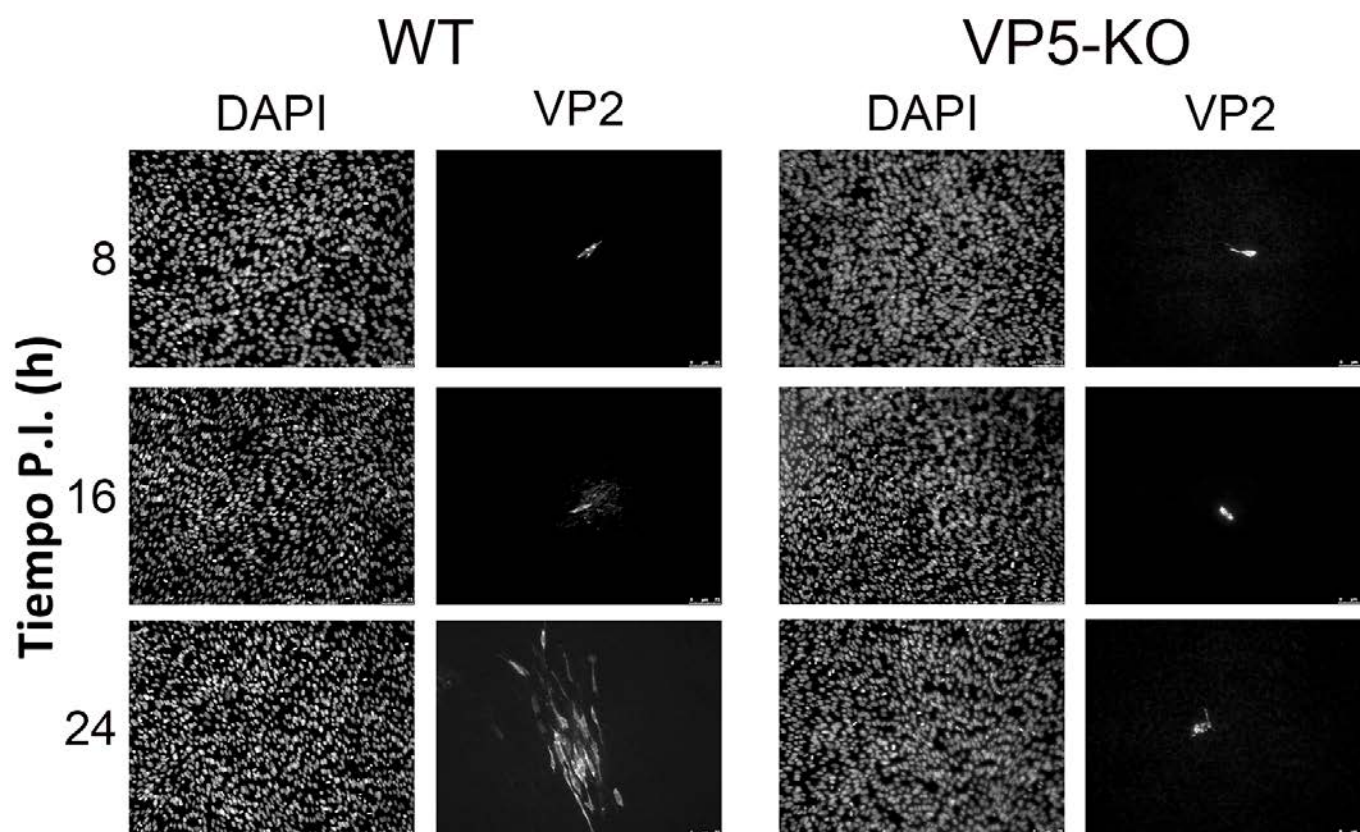


Figura 20. Efecto de la expresión de la proteína VP5 en la diseminación de IBDV al nivel de célula independiente. Monocapas preconfluentes de células QM7 fueron infectadas a baja multiplicidad ($MOI=0,005$) con los virus IBDV-WT o IBDV-VP5-KO. Tras el periodo de absorción, los cultivos fueron lavados dos veces con medio fresco y cubiertos con medio semisólido. A diferentes tiempos (8, 16 o 24 h p.i.) el medio semisólido fue eliminado y las monocapas procesadas para inmunofluorescencia con suero anti-VP2. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las muestras fueron visualizadas mediante CLSM. Las señales fluorescentes fueron recogidas por separado empleando los filtros apropiados. Las micrografías presentadas son ejemplos característicos de las imágenes obtenidas a los tiempos p.i. indicados. Los paneles de la izquierda y de la derecha muestran la tinción con DAPI y con VP2 de la misma área del cultivo, respectivamente. Las barras corresponden a 75 μm .

En ambas infecciones, la señal inmunofluorescente específica para la proteína VP2, indicativa de la acumulación de viriones en el interior de las células, comenzó a detectarse de forma inequívoca a partir de las 8 h p.i. Como se esperaba, en este punto temporal, menos del 1% del total de la población celular era positiva frente a VP2. A su vez, las células positivas se

encontraban rodeadas por células no infectadas, sin señal detectable correspondiente a la proteína VP2. De acuerdo a las observaciones realizadas, esta situación se mantiene hasta las 16 h p.i. En este punto temporal, aunque en ambas muestras se seguían visualizando células individuales infectadas rodeadas por células negativas para VP2, la periferia de una elevada proporción (aproximadamente 50%) de las células positivas detectadas en los cultivos infectados con el virus IBDV-WT presentaba un abundante punteado específico para la proteína bajo estudio. Este patrón inmunofluorescente no se detectó en las células infectadas con el virus IBDV-VP5-KO. Las diferencias observadas en las muestras fijadas a las 24 h p.i. fueron mucho más ostensibles. A este tiempo, mientras que la señal de VP2 detectada en los cultivos infectados con el virus IBDV-VP5-KO permanecía restringida a células individuales y aisladas, en los cultivos infectados con el virus IBDV-WT se observaron abundantes grupos discretos conteniendo aproximadamente entre 25 y 50 células fuertemente positivas para la proteína VP2. La progresión en el tiempo de este patrón de infección se siguió observando, de manera exacerbada, en las muestras fijadas entre las 32-48 h p.i (datos no mostrados).

El característico punteado inmunofluorescente detectado en la periferia de las células infectadas con el virus IBDV-WT a las 16 h p.i. podría proceder de la presencia de partículas virales recién liberadas. Para explorar esta posibilidad e intentar observar este fenómeno con mayor detalle, monocapas preconfluentes de células QM7 fueron infectadas a baja multiplicidad ($MOI=0,005$) con IBDV-WT o IBDV-VP5-KO, recogidas a las 16 h p.i. y procesadas como se ha descrito anteriormente. En este caso, con el fin de visualizar y delimitar la membrana celular, además del suero anti-VP2, las muestras fueron incubadas con mAb específico capaz de reconocer diferentes miembros de la familia de las cadherinas, que se localizaban preferentemente en la PM. Los resultados de este análisis están resumidos en la **Figura 21**, en la que se muestra un conjunto representativo de imágenes correspondientes a ambas infecciones.

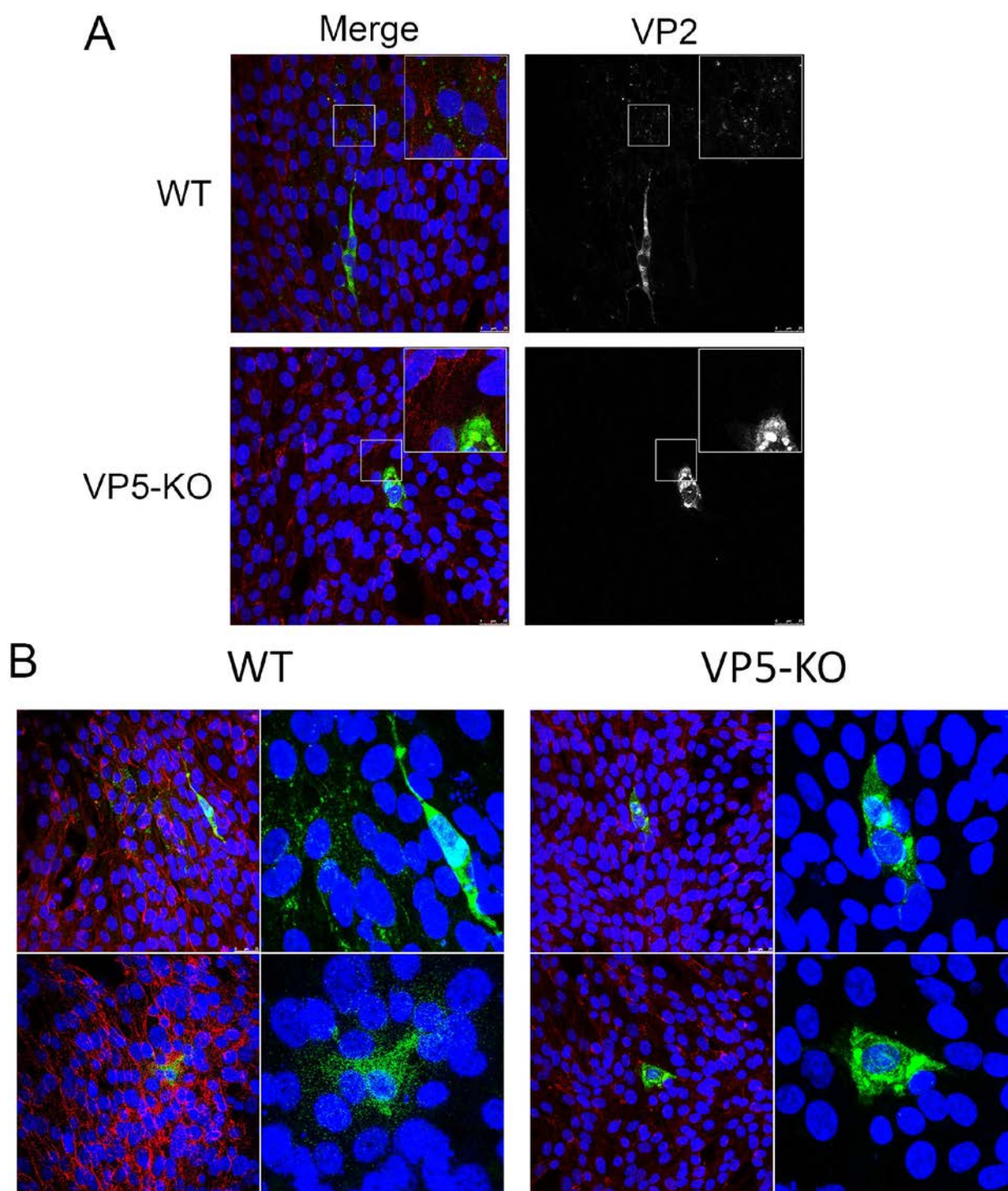


Figura 21. Visualización de la liberación de IBDV al nivel de célula individual. Monocapas preconfluente de células QM7 fueron infectadas a baja multiplicidad ($MOI=0,005$) con los virus IBDV-WT o IBDV-VP5-KO. Tras el periodo absorción, los cultivos fueron lavados dos veces con medio fresco y cubiertos con medio semisólido. A 16 h p.i. el medio semisólido fue eliminado y las monocapas procesadas para inmunofluorescencia con suero anti-VP2 (verde) y anti-Pan cadherina (rojo), respectivamente. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las muestras fueron mediante CLSM. Las señales fluorescentes fueron recogidas por separado empleando los filtros apropiados. **A)** Los paneles de la izquierda muestran el solapamiento de las tres señales fluorescentes (Merge). Los paneles de la derecha muestran únicamente la señal de VP2. Los insertos muestran magnificaciones más elevadas ($\times 2.5$) de las áreas enmarcadas. Las barras corresponden a 25 μm . **B)** Los paneles de la izquierda muestran el solapamiento de las tres señales fluorescentes (Merge). Los paneles de la derecha muestran el solapamiento de la señal de VP2 y de DAPI de una ampliificación detallada del panel izquierdo a una magnificación más alta ($\times 3$). Las barras corresponden a 25 μm .

Como era de esperar atendiendo a los resultados obtenidos previamente, los cultivos infectados con ambos virus contenían células positivas para la proteína VP2 circundadas por células negativas para este antígeno viral. Es importante destacar que, en ambos casos, las células positivas parecían seguir siendo viables, mostrando una apariencia plana y alargada, con uno o dos núcleos aparentemente intactos. De forma general, las células inmunopositivas observadas en ambos cultivos presentaban una señal intracelular caracterizada por la presencia de varios agregados fluorescentes acompañados por un punteado fluorescente diseminado en el citoplasma celular. Al igual que en el experimento anterior, el punto diferenciador entre los patrones de señal de VP2 de ambos cultivos radicó en la presencia de un abundante punteado fluorescente localizado en la periferia de las células infectadas con el virus IBDV-WT. Como se puede observar en las imágenes presentadas, el punteado fluorescente cubre un área que sobrepasa ampliamente la frontera establecida por la membrana de las células positivas para la proteína VP2. Por lo tanto, se puede interpretar que este patrón, detectado exclusivamente en células infectadas con el virus IBDV-WT, refleja la presencia de partículas virales recién egresadas de las células infectadas.

1.9. Determinación del papel de VP5 en la ultraestructura de células infectadas por IBDV

Los resultados obtenidos en los experimentos de diseminación de IBDV al nivel de célula individual a las 16 h p.i. indicaron la necesidad de realizar un estudio comparativo de la ultraestructura de las células infectadas con IBDV-WT e IBDV-VP5-KO. Para ello, monocapas preconfluentes de células QM7 crecidas sobre discos de zafiro fueron infectadas a alta multiplicidad (MOI=3) con IBDV-WT o IBDV-VP5-KO. Como control en estos experimentos, se emplearon cultivos no infectados. A las 16 y 24 h p.i., las monocapas fueron procesadas para análisis por TEM. Teniendo en cuenta los datos descritos anteriormente, el estudio se centró principalmente en el análisis de las muestras recogidas a 16 h p.i. (**Figura 22A**).

A este tiempo, el citoplasma de las células infectadas con ambos virus presenta los característicos PVAs, ya detectables a partir de las 8 h p.i. (**Figura 14**). Los PVAs observados a las 16 h p.i. se presentan en mayor número y tamaño. Estos PVAs están constituidos por un gran número de partículas virales empaquetadas regularmente, formando estructuras cuasi-cristalinas que en la mayoría de los casos se localizan en regiones con una elevada abundancia mitocondrial. Una gran parte de los PVAs detectados en cultivos infectados con IBDV-WT se encuentran parcial o totalmente circundados por una estructura membranosa (**Figura 22B, panel izquierdo**).

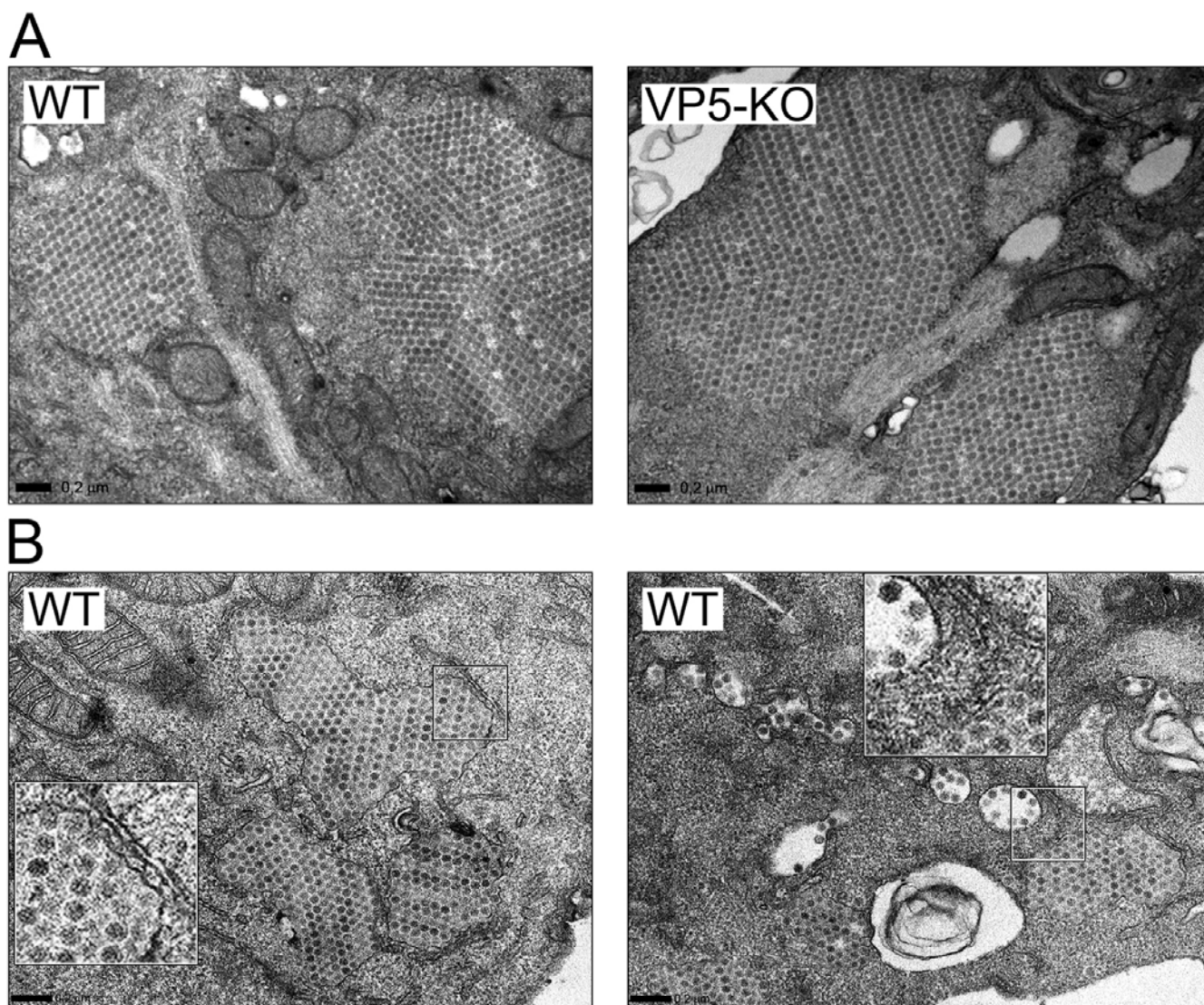


Figura 22. Efecto de la expresión de la proteína VP5 en el ultraestructura de células infectadas por IBDV. Cultivos de células QM7 crecidos sobre discos de zafiro fueron infectadas a alta multiplicidad ($MOI=3$) con IBDV-WT o IBDV-VP5-KO. Los cultivos fueron recogidos a 16 h p.i. y procesados para su análisis mediante TEM. **A)** Ensamblaje en PVAs. Los paneles muestran ejemplos característicos de PVAs detectados en el citoplasma de células infectadas tanto con IBDV-WT como con IBDV-VP5-KO, habitualmente asociados a mitocondrias. **B)** Detección de PVAs y VCVs envueltos por membranas simples. Imágenes representativas que muestran detalles del citoplasma de células infectadas con el virus IBDV-WT conteniendo tres PVAs rodeadas por una membrana simple (panel izquierdo) y tres PVAs en una región cercana ocupada por VCVs también rodeados por una membrana simple (panel derecho). Los insertos muestran imágenes aumentadas ($\times 2.5$) de las áreas enmarcadas. Las barras corresponden a $0,2 \mu m$.

Por otra parte, el citoplasma de las células infectadas con el virus IBDV-WT contenía una abundante cantidad de partículas virales individuales (en contraposición a las matrices de viriones que conforman los PVAs), bien de forma independiente o en pequeños grupos, invariablemente localizadas en el interior de vesículas membranosas, de forma y tamaño variable, denominadas genéricamente como “vesículas que contienen viriones” (*virus containing vesicles*; VCVs) (**Figura 22B, panel derecho**). La presencia de estas dos estructuras, las VCVs y los cinturones

membranosos que circundan los PVAs, no había sido descrita previamente en cultivos infectados por IBDV. Una observación de gran importancia es la ausencia total de ambas estructuras en cultivos infectados con el virus IBDV-VP5-KO.

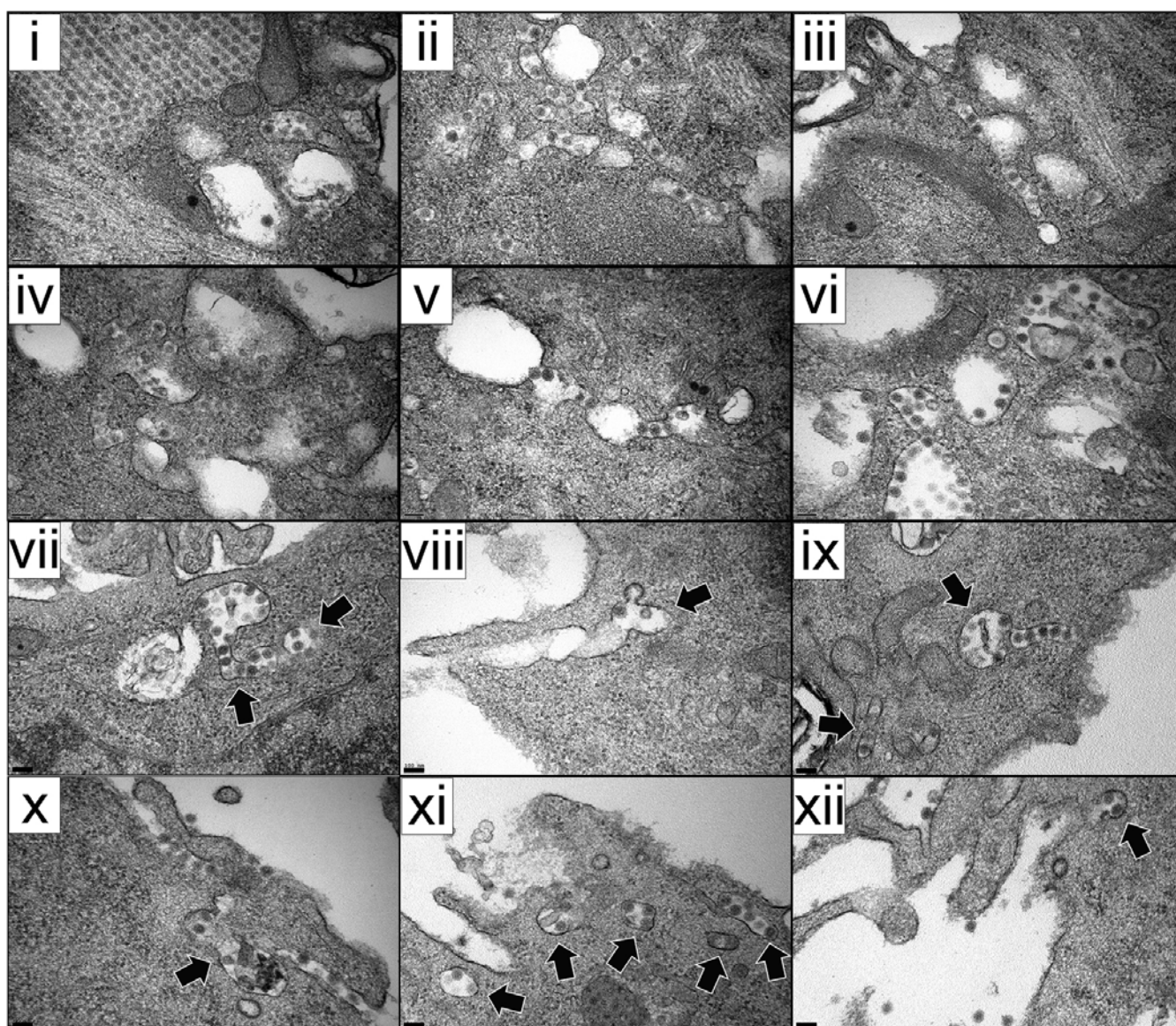


Figura 23. Galería de VCVs localizados en células infectadas por IBDV. Micrografías mostrando distintas VCVs detectadas en células QM7 infectadas a alta multiplicidad (MOI=3) con el virus IBDV-WT. Las muestras fueron recogidas y procesadas para TEM a 16 h p.i. Las VCVs localizados en la proximidad o aparentemente fusionados a la PM están indicados con flechas. Las barras corresponden a 0,1 µm.

Las VCVs detectadas presentan una única membrana y se encuentran distribuidas por todo el citoplasma, aunque su abundancia relativa es aparentemente superior en la proximidad de la PM. Los viriones localizados en su interior mostraban un contorno poligonal y un diámetro aparentemente idéntico al de las partículas de IBDV ensambladas en PVAs. En la **Figura 23** se presenta una galería de imágenes representativas de VCVs detectadas en células infectadas con el virus IBDV-WT.

Por otro lado, se observó que la cara externa de la PM de un gran porcentaje (>50%) de las células infectadas con IBDV-WT, las células que contienen VCVs, está tapizada con partículas virales (**Figura 24**). Por otra parte, la continuidad de la PM en la proximidad de estas partículas se encuentra, en muchos casos, aparentemente perturbada (**Figura 23, paneles viii-xii; Figura 24**). Estas imágenes sugieren que la liberación del virus podría producirse mediante un proceso de fusión entre las VCVs y la PM.

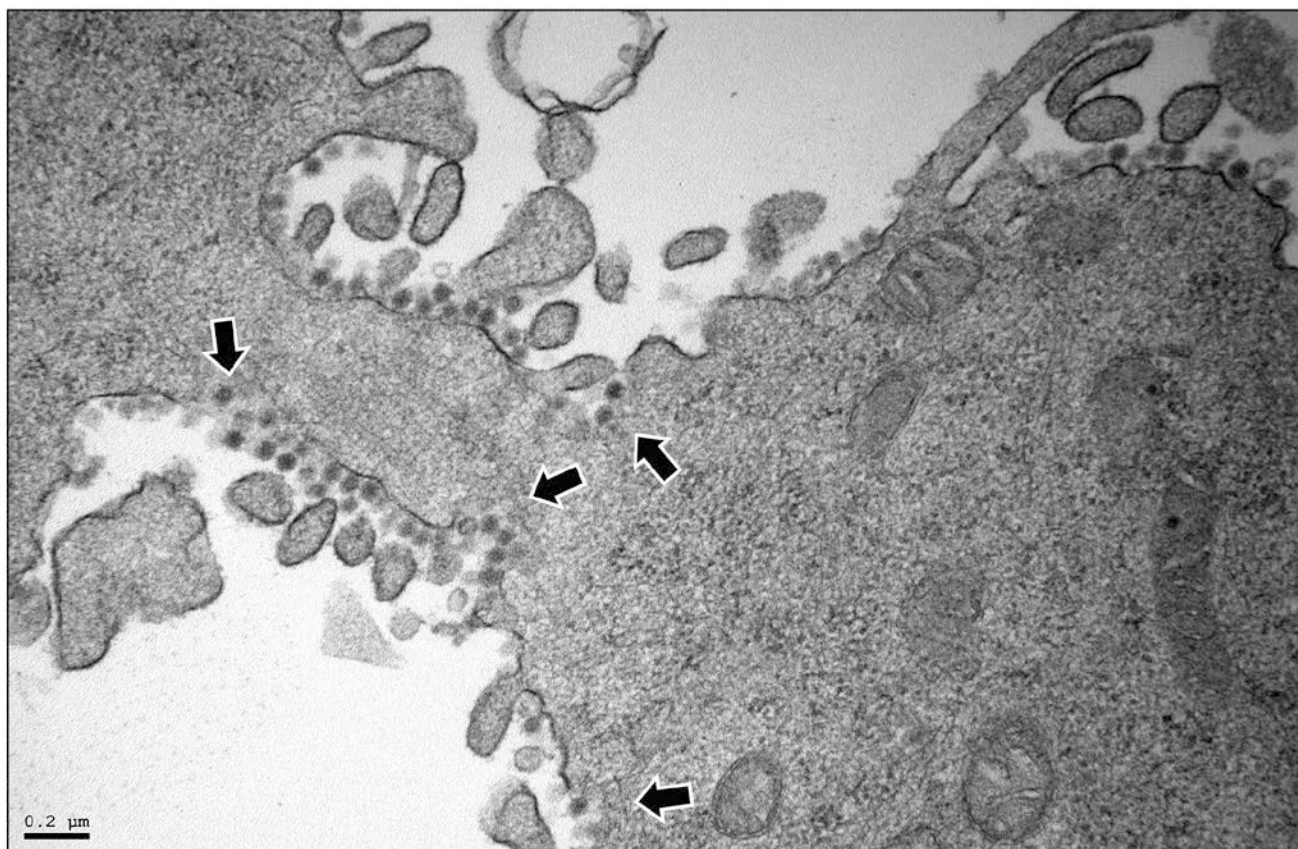


Figura 24. Viriones de IBDV aparentemente liberados a partir de células infectadas. Micrografías mostrando un detalle de una célula QM7 infectada a alta multiplicidad (MOI=3) con IBDV-WT. Las muestras fueron recogidas y procesadas para TEM a 16 h p.i. En la imagen se observa la presencia de viriones de IBDV unidos a la superficie externa de la PM. Las flechas indican perturbaciones de la PM, probablemente asociadas a la liberación de partículas virales. Las barras corresponden a 0,2 μm .

El posible proceso de fusión de membranas y salida al medio extracelular de viriones confinados en el interior de las VCVs se ve representado en la **Figura 25**. Sin embargo, dada la naturaleza estática de las imágenes de TEM, no permite confirmar esta interpretación.

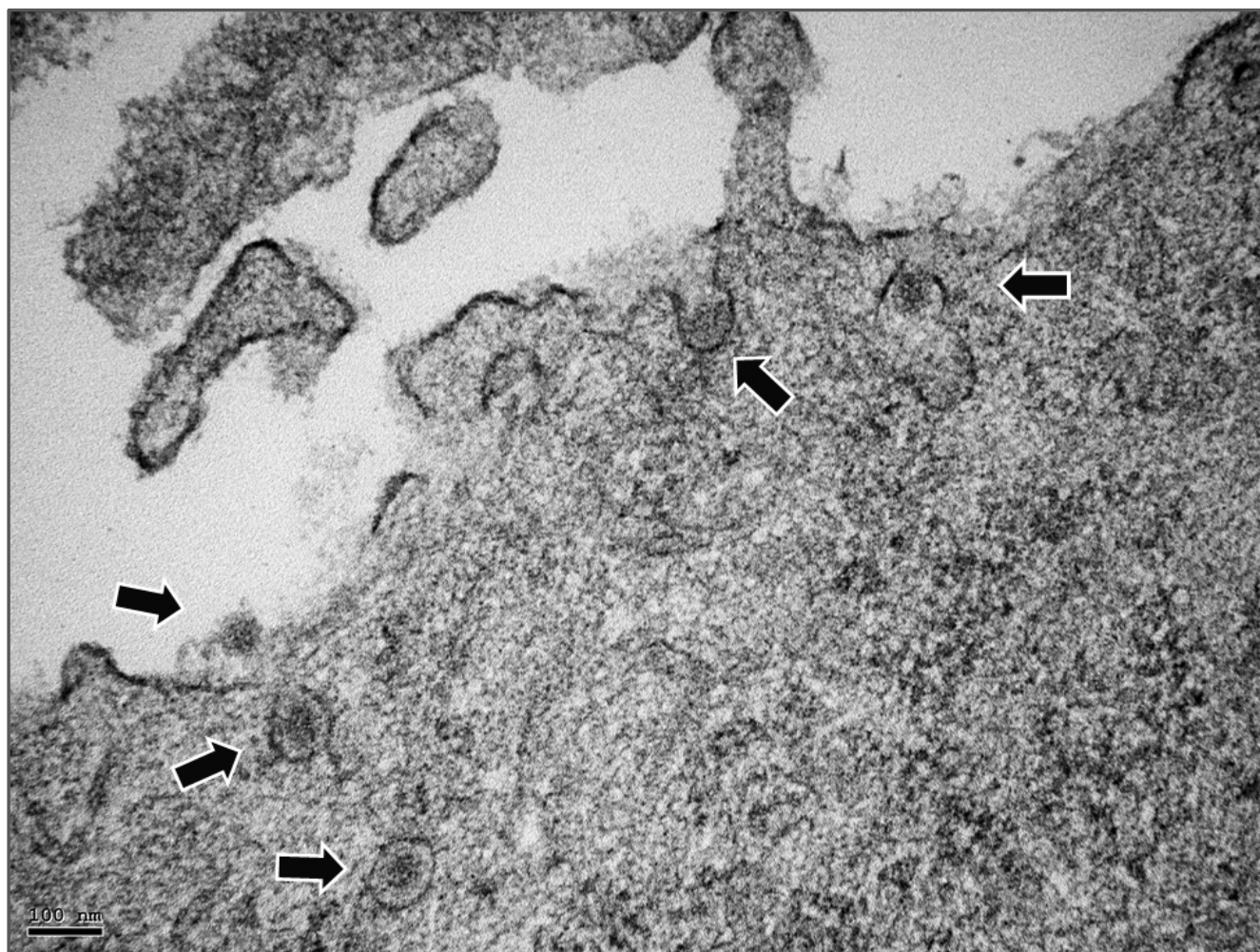


Figura 25. Proceso no lítico de liberación activa de partículas infeccivas de IBDV a partir de células infectadas. Micrografías mostrando un detalle de una célula QM7 infectada a alta multiplicidad (MOI=3) con IBDV-WT. Las muestras fueron recogidas y procesadas para TEM a 16 h p.i. En la imagen se observan varias VCVs en la proximidad de la PM, así como la presencia de un virión probablemente recién liberado al medio extracelular. Las barras corresponden a 0,1 μ m.

Por último, la inspección de las muestras recogidas a las 24 h p.i., mostró, de manera exacerbada, los mismos signos de infección observados en las células recogidas a las 16 h p.i. De igual manera, en infecciones con ambos virus se detectó la presencia de PVAs de mayor tamaño a los detectados a las 16 h p.i., acompañados por VCVs y abundantes viriones asociados a la cara extracelular de la PM, únicamente en las células infectadas con IBDV-WT (datos no mostrados). Adicionalmente, las muestras analizadas a este tiempo p.i. contienen restos celulares junto con PVAs, VCVs (únicamente presentes en las células infectadas con el virus IBDV-WT), y ensamblados tubulares similares a aquellos descritos como túbulos de tipo II formados por la proteína VP4 (Granzow et al., 1997), probablemente correspondientes a células lisadas durante la preparación de las muestras (Figura 26).

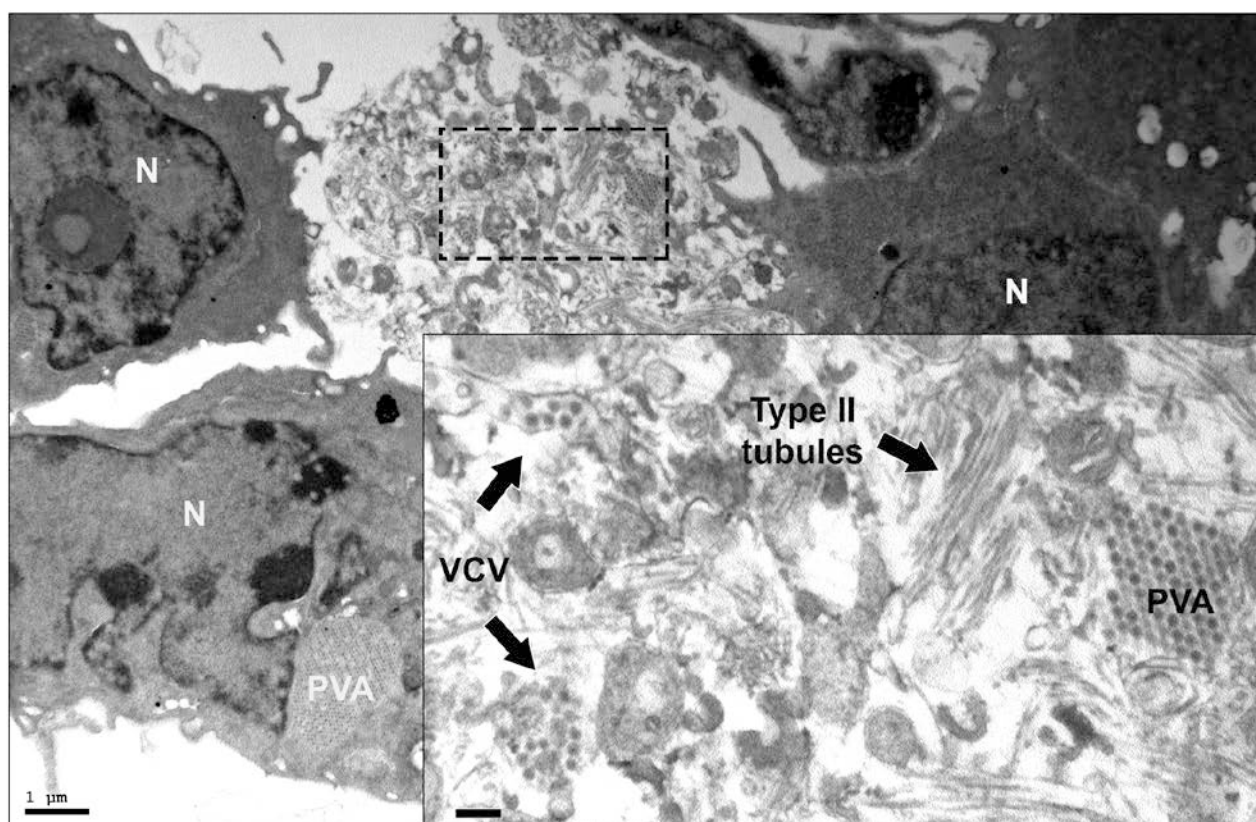


Figura 26. Restos celulares provenientes de la lisis de células infectadas por IBDV. Micrografías mostrando células QM7 infectadas a alta multiplicidad (MOI=3) con IBDV-WT. Las muestras fueron recogidas y procesadas para TEM a 24 h p.i. La imagen muestra tres células infectadas con sus PMs intactas junto con restos celulares. El inserto muestra una imagen aumentada (x2.5) del área enmarcada, conteniendo los distintos derivados macromoleculares del ensamblado de IBDV, como PVAs, VCVs y túbulos de VP4 tipo II. Las barras corresponden a 1 y 0,2 µm, respectivamente.

2. CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA VP5 CON LA MEMBRANA PLASMÁTICA (PM)

2.1. Implicación del dominio policationico del extremo C-terminal de la proteína VP5 en su localización subcelular

Uno de los objetivos fundamentales planteados al inicio de este trabajo consistía en determinar las bases moleculares del tropismo membranar de la proteína VP5, un elemento fundamental para la determinación del papel funcional de la proteína. Como se ha descrito anteriormente, un estudio anterior de nuestro grupo había identificado un dominio ligeramente hidrofóbico en la región central de VP5 (aminoácidos 69-88) que, de acuerdo a alguno de los algoritmos computacionales disponibles en ese momento (TM pred y TopPred), podría actuar como dominio transmembranar. Esta información sirvió de base para sugerir la posibilidad de que esta proteína pudiera comportarse como una proteína de membrana tipo II (Lombardo et al., 2000). Sin embargo, la ausencia de un péptido señal en la secuencia primaria de la proteína junto con los

resultados negativos de predicciones topológicas realizadas utilizando algoritmos actualizados (SPOCTOCUS, PHOBIUS, DAS y HMMTOP), nos llevaron a descartar esa hipótesis al comienzo de este trabajo.

La inspección de la secuencia primaria de la proteína permitió detectar la presencia de una región policationica (aminoácidos 132-143) altamente conservada, localizada en el extremo C-terminal de la proteína. Esta región está formada por tres grupos de aminoácidos básicos (K y/o R) consecutivos ($^{132}\text{KR}^{133}$, $^{136}\text{KRR}^{138}$ y $^{142}\text{RK}^{143}$) (**Figura 7**). De acuerdo a lo observado con diferentes proteínas celulares, este dominio policationico podría interactuar con lípidos aniónicos localizados en la cara citosólica de la membrana de diferentes compartimentos celulares (Goldenberg and Steinberg, 2010).

Para analizar la posible implicación del dominio C-terminal de VP5 en el tropismo membranal de VP5, se generaron dos proteínas quiméricas, formadas por la fusión de la proteína VP5 carente de la metionina iniciadora o por su dominio C-terminal (residuos 122-145) al extremo C-terminal de la proteína EGFP. Estas dos construcciones, generadas sobre el vector de expresión pEGFP-C1, fueron denominadas GFP/VP5 y GFP/CT122-145, respectivamente. Los vectores plasmídicos que contenían ambas construcciones fueron empleados para transfectar cultivos de células HeLa. Como control para estos experimentos se empleó el plásmido pEGFP-C1 vacío. A las 12 h post-transfección, los cultivos fueron fijados y procesados para inmunofluorescencia empleando un mAb de ratón específico frente a la proteína GFP, visualizándose mediante CLSM. Con el fin de identificar los núcleos celulares, las muestras fueron incubadas con DAPI.

Como se muestra en la **Figura 27**, mientras que la proteína GFP control muestra una señal difusa predominantemente citoplasmática, la proteína de fusión GFP-VP5 se acumula de forma mayoritaria en la PM. Por su parte, la proteína GFP/CT122-145 presentó a un patrón mixto membranal/nuclear. Estos resultados indican que la región C-terminal policationica es suficiente para dirigir la acumulación de la proteína quimérica GFP/CT122-145 a la PM. Es importante destacar que trabajos previos ya mostraron que la fusión de los dominios C-terminales polibásicos de algunas GTPasas como Rit o Rin a GFP, además de promover la interacción de estas proteínas quiméricas con la PM, también promueven su transporte al núcleo (Heo et al., 2006). Por ello, la presencia en núcleo de la proteína de fusión GFP/CT122-145 era esperable.

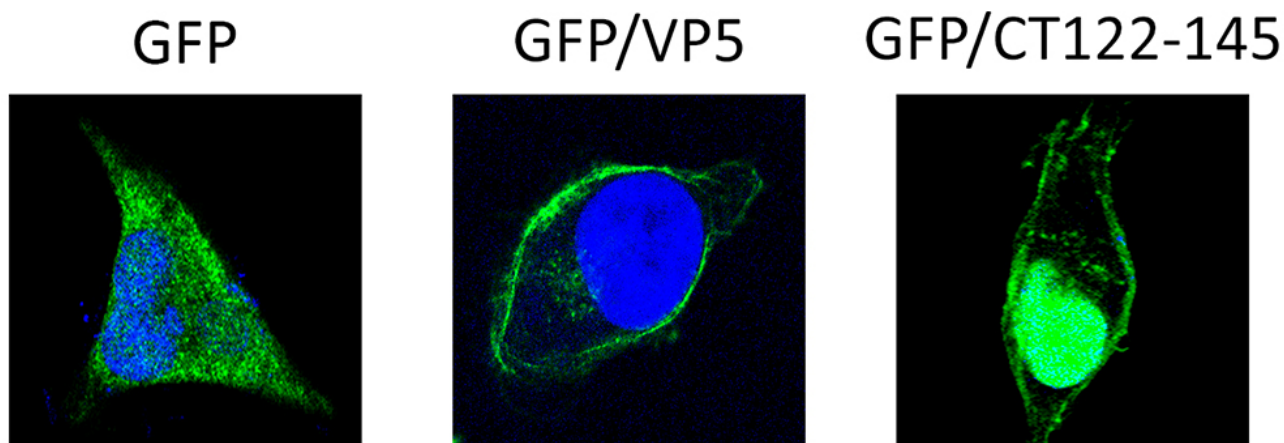


Figura 27. Papel del dominio C-terminal de VP5 en la localización subcelular de la proteína GFP. Células HeLa fueron transfectadas con plásmidos que codifican diferentes versiones de la proteína GFP, bien en su forma nativa (GFP) o conteniendo fusiones C-terminales con la proteína VP5 completa (GFP/VP5) o únicamente con sus 24 aminoácidos C-terminales (GFP/CT122-145). A las 12 h post transfección, los cultivos fueron fijados y procesados para inmunofluorescencia empleando un mAb anti-GFP de ratón seguido por una incubación con anticuerpo anti-ratón de cabra unido a Alexa-488 (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las células fueron visualizadas mediante CLSM. Las señales fluorescentes fueron recogidas por separado usando los filtros apropiados. Las imágenes presentadas se corresponden a secciones confocales que muestran la superposición de las dos señales fluorescentes.

Los datos descritos anteriormente sugerían la implicación del dominio C-terminal de VP5 en su localización en PM. Con el fin de analizar esta hipótesis en mayor profundidad, se construyeron tres versiones recombinantes del gen de VP5 que codifican proteínas de delección que carecen de los 5 (FVP5 Δ 5CT), 10 (FVP5 Δ 10CT) o 15 (FVP5 Δ 15CT) aminoácidos C-terminales de la proteína, respectivamente. Para facilitar su detección, se fusionó el epítipo FLAG al extremo N-terminal de estas proteínas. Estas construcciones fueron empleadas para generar tres VACVs recombinantes, denominados VT7/FVP5 Δ 5CT, VT7/FVP5 Δ 10CT y VT7/FVP5 Δ 15CT, respectivamente. Por último, se generó un cuarto VACV recombinante que codifica la proteína VP5 completa fusionada al epítipo FLAG. Este último virus recombinante, denominado VT7/FVP5WT, fue empleado como control para los subsecuentes experimentos. La **Figura 28A** muestra un diagrama que representa la estructura de las construcciones descritas.

Para analizar la expresión y distribución subcelular de las proteínas FVP5 mutantes, cultivos de células HeLa fueron infectados a alta multiplicidad (MOI=3) con los correspondientes VACVs recombinantes. A las 6 h p.i. se añadió IPTG al medio de cultivo para inducir la expresión de los genes recombinantes. A las 12 h post-inducción, los cultivos fueron recogidos para su análisis mediante *Western blotting*, o fijados y procesados para inmunofluorescencia empleando un mAb de ratón frente al epítipo FLAG.

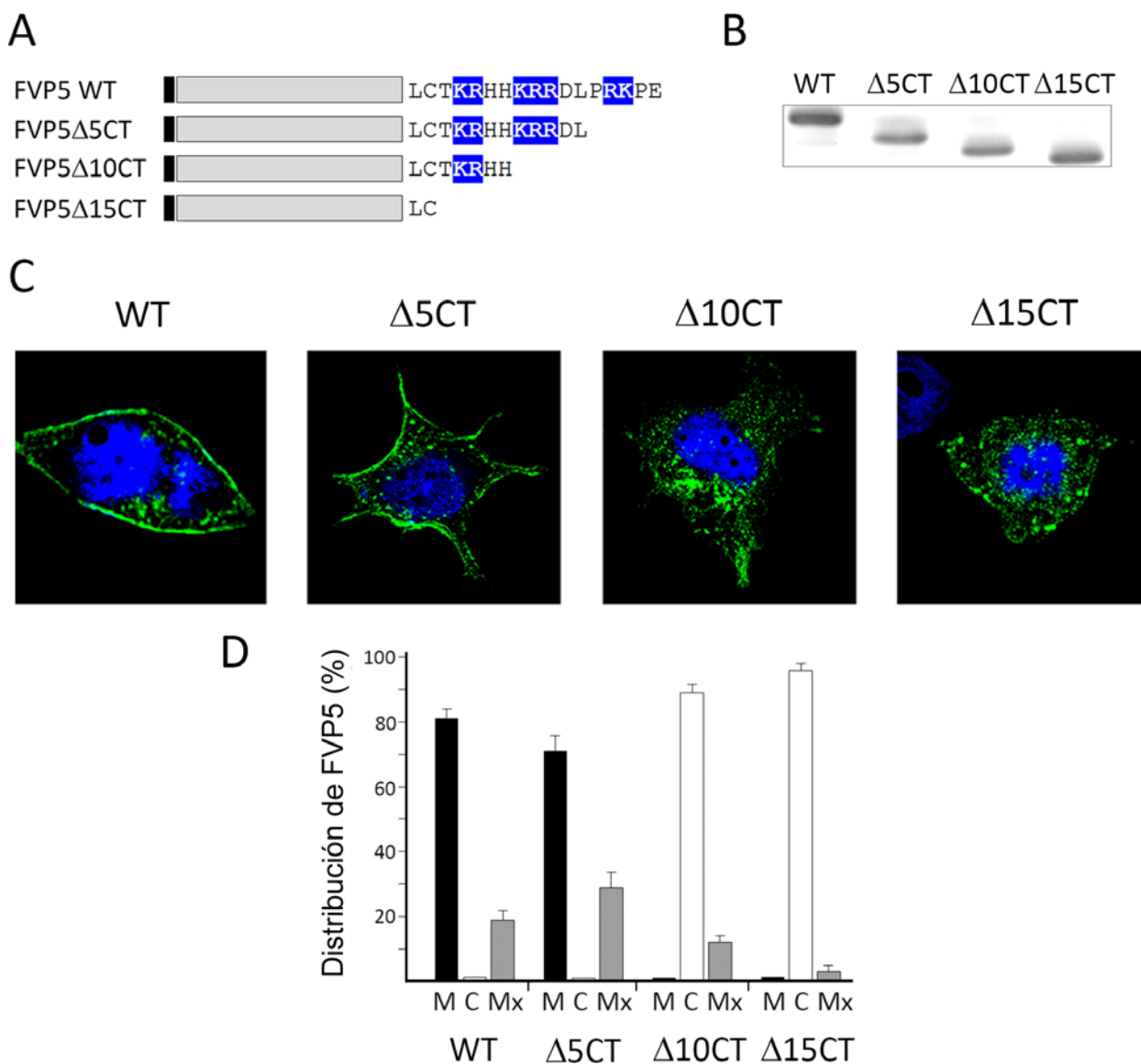


Figura 28. Efecto de la delección del extremo C-terminal de VP5 sobre la localización subcelular de la proteína. **A)** El esquema muestra las distintas versiones de la proteína FVP5, tanto completa (WT) como carente de los últimos 5 (Δ5CT), 10 (Δ10CT) o 15 (Δ15CT) aminoácidos C-terminales, expresadas por los distintos VACVs recombinantes usados en este análisis. Las cajas negras indican la posición del epítipo FLAG. Los aminoácidos cargados positivamente en el extremo C-terminal de la proteína se muestran en color azul. **B)** Análisis de expresión de proteínas. Muestras de células HeLa infectadas con VACVs recombinantes que expresan las distintas proteínas bajo estudio fueron analizadas mediante Western blotting usando un mAb anti-FLAG. **C)** Distribución subcelular de FVP5. Imágenes correspondientes a células individuales. Los cubreobjetos conteniendo las células HeLa infectadas con los diferentes VACVs fueron procesadas para inmunofluorescencia usando un mAb anti-FLAG de ratón seguido por incubación con anticuerpo anti-IgG de ratón unido a Alexa-488 (Verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Azul). Las células fueron visualizadas mediante CLSM. Las señales fluorescentes fueron recogidas por separado usando los filtros apropiados. Las imágenes presentadas se corresponden a secciones confocales que muestran la superposición de las dos señales fluorescentes. **D)** Análisis estadístico. Las células que muestran más del 70% del total de la señal frente al epítipo FLAG en la PM o en el citoplasma celular fueron atribuidas a los grupos P o C, respectivamente. El resto de células, que presentaba una distribución mixta PM/citoplasma, fue incluido en el grupo Mx. El análisis fue realizado a partir de datos recogidos en tres experimentos independientes usando un total de más de 300 imágenes de células individuales. La gráfica muestra el tamaño de las diferentes poblaciones celulares observadas en cultivos infectados con los diferentes virus.

El análisis mediante *Western blotting* reveló que las deleciones en el extremo C-terminal de VP5 resultan en la síntesis de proteínas recombinantes con movilidades electroforéticas incrementadas y proporcionales al tamaño de las deleciones introducidas (**Figura 28B**). Una vez comprobada la correcta expresión de las diferentes proteínas recombinantes, el estudio se centró en caracterizar los patrones de localización subcelular de cada una de ellas. Para ello, se analizaron más de 300 imágenes de células individuales, considerándose como acumulación predominante en la PM (P) o en el citoplasma (C) aquellas células que mostraban más del 70% del total de la señal específica para el epítipo FLAG en alguna de estas dos localizaciones. El resto de células fueron consideradas como pertenecientes a un tercer grupo con un patrón de distribución mixto (Mx) PM/citoplasma. Como se muestra en las **Figura 28C** y **Figura 28D**, las proteínas FVP5WT y FVP5Δ5CT mostraron una acumulación mayoritaria en PM. Sin embargo, en el caso de la proteína FVP5Δ10CT se observó un patrón predominantemente citoplasmático, pero manteniendo una señal residual en PM. Por último, la proteína FVP5Δ15CT, carente de los tres grupos de residuos electropositivos, presentó un patrón punteado exclusivamente restringido al citoplasma celular. Tomados en conjunto, estos resultados indican que los 15 aminoácidos C-terminales, que comprenden la región policationica, son críticos para la localización de la proteína VP5 en PM.

2.2. Determinación del papel de la carga electropositiva del dominio policationico del extremo C-terminal de la proteína VP5 en su tropismo membranar

Los resultados anteriores sugerían que el tropismo membranar de la proteína VP5 podría estar mediado por el establecimiento de interacciones electrostáticas entre el extremo C-terminal polibásico de VP5 y lípidos aniónicos presentes en PM. De acuerdo a esta hipótesis, la reducción de la carga neta electropositiva de esta región debería afectar significativamente a la distribución subcelular de la proteína. Para analizar esta posibilidad, se procedió a sustituir los aminoácidos electropositivos del extremo C-terminal de la proteína por residuos de alanina (A), un aminoácido no polar. De esta manera, se generaron cuatro versiones mutantes de VP5 fusionadas al epítipo FLAG, en las cuales los residuos básicos de los tres grupos electropositivos habían sido reemplazados selectivamente por aminoácidos de alanina. Como control, se empleó la proteína FVP5WT anteriormente descrita. La **Figura 29A** muestra un diagrama de la configuración de los extremos C-terminales de los distintos mutantes generados. El gen recombinante FVP5M1 carece de los tres grupos de residuos electropositivos, mientras que las proteínas mutantes FVP5M2, FVP5M3 y FVP5M4 carecen de los grupos ¹⁴²RK¹⁴³, ¹³⁶KRR¹³⁸ y ¹³²KR¹³³, respectivamente. Las construcciones descritas fueron empleadas para generar los VACVs recombinantes. El análisis de la

expresión y distribución subcelular de estas proteínas se realizó como se ha descrito en el apartado anterior.

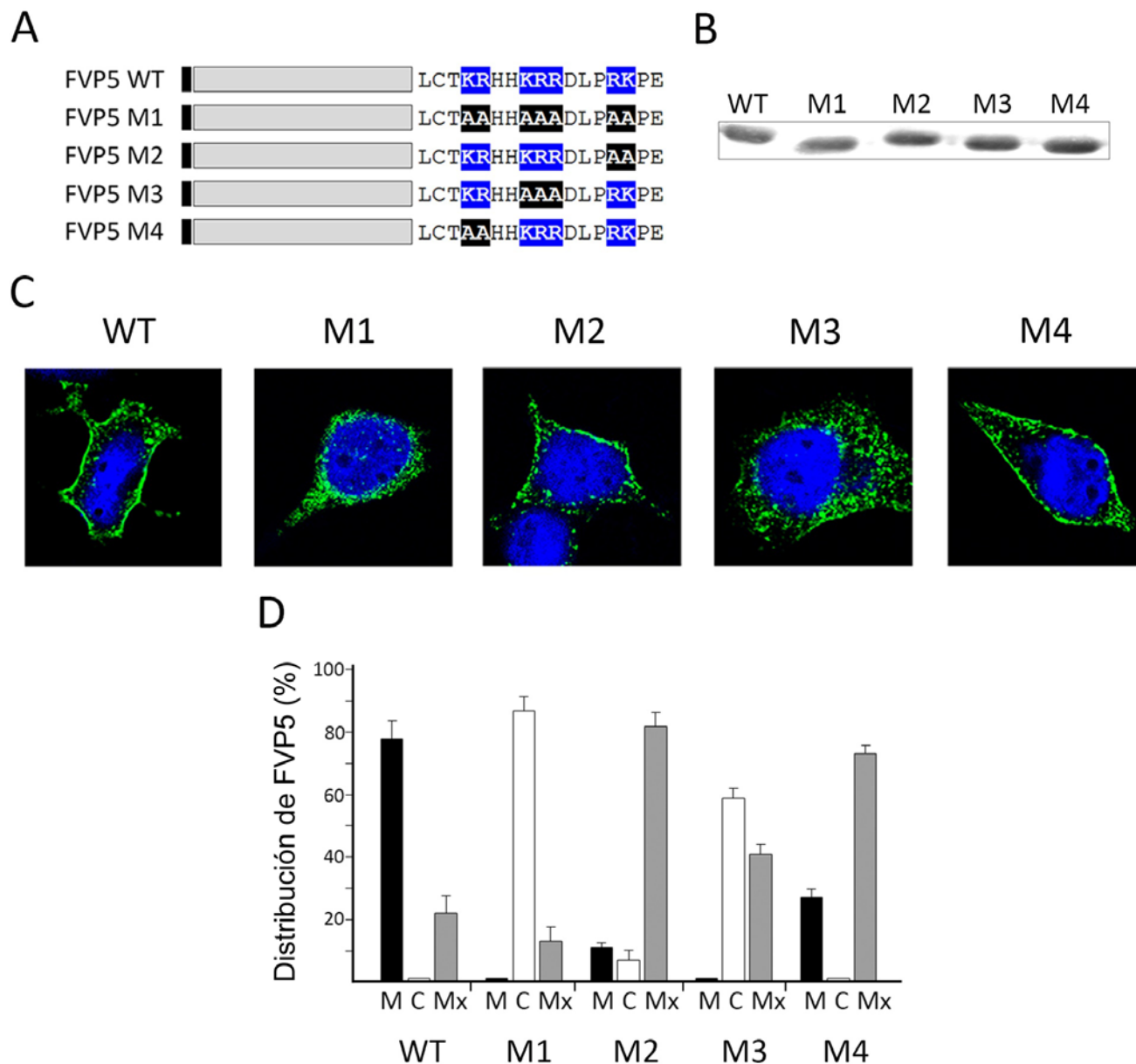


Figura 29. Contribución de la carga neta electropositiva del extremo C-terminal de la proteína VP5 en su localización subcelular. **A)** El esquema muestra las distintas versiones de la proteína FVP5, tanto completa (WT) como las distintas versiones con mutaciones de reemplazo por aminoácidos de alanina en la cola C-terminal de la proteína VP5 (M1, M2, M3 y M4), expresadas por los distintos VACVs recombinantes usados en este análisis. La proteína M1 carece de los 3 grupos catiónicos, mientras que las proteínas M2, M3 y M4 carecen de los grupos ¹⁴²RK¹⁴³, ¹³⁶KRR¹³⁸ y ¹³²KR¹³³, respectivamente. Las cajas negras indican la posición del epítipo FLAG. Los aminoácidos cargados positivamente en el extremo C-terminal están indicados en azul, y los aminoácidos de alanina que los reemplazan en negro **B)** Análisis de expresión de proteínas. Muestras de células HeLa infectadas con VACVs recombinantes que expresan las distintas proteínas bajo estudio fueron analizadas mediante Western blotting usando un mAb anti-FLAG. **C)** Distribución subcelular de FVP5. Las muestras fueron obtenidas como se describe en la Figura 28. **D)** Análisis estadístico. El análisis fue realizado como se describe en la Figura 28, empleando datos recogidos en tres experimentos independientes usando un total de más de 300 imágenes de células individuales. La gráfica muestra el tamaño de las diferentes poblaciones celulares observadas en cultivos infectados con los diferentes virus.

Como era de esperar, el análisis mediante *Western blotting* mostró la existencia de variaciones mínimas en el perfil electroforético de las diferentes proteínas mutantes (**Figura 29B**). Como se muestra en la **Figura 29C** y **Figura 29D**, las proteínas FVP5CTM2 y FVP5CTM4 presentaron una distribución mayoritariamente mixta (PM/citoplasma). Sin embargo, en el caso de las proteínas FVP5M1 y FVP5M3, se observó una drástica reducción de su capacidad de interacción con la PM, acumulándose de forma preponderante en el citoplasma celular. Estos resultados muestran que la reducción de la carga neta electropositiva de la cola C-terminal de VP5 provoca un efecto significativo en la localización subcelular de la proteína que, en el caso de la eliminación completa de los residuos básicos, da lugar a una pérdida completa del tropismo membranal de ésta, confirmando la validez de la hipótesis inicial.

2.3. Interacción de la proteína VP5 con fosfoinosítidos a través de su región policatiónica

Se ha determinado que algunas proteínas celulares (tales como GTPasas de las familias Ras, Rho, Arf y Rab) ([Goldenberg and Steinberg, 2010](#)) emplean dominios C-terminales cargados positivamente para interactuar, a través de interacciones electrostáticas, con lípidos aniónicos anclados en la cara citosólica de la PM. Por ello, se decidió evaluar la capacidad de la proteína VP5 para interactuar con lípidos de membrana. La realización de estos experimentos requería obtener preparaciones de diferentes versiones de la proteína VP5 purificada. Para ello, se procedió a expresar diferentes versiones del gen FVP5 en cultivos de *E. coli*, así como a desarrollar una metodología de purificación mediante cromatografía de afinidad (ver “Materiales y Métodos”).

El resultado de la purificación fue analizado mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie, junto con un patrón de concentraciones conocidas de la proteína BSA (0,4, 2 y 10 mg/ml) (**Figura 30A**). Como se observa en la figura, el protocolo empleado permite el aislamiento de una banda proteica mayoritaria de aproximadamente 22 kDa con una concentración en torno a 5 mg/ml. El análisis mediante Western blot realizado con un suero frente al epítipo FLAG y a la proteína VP5 confirmó la identidad de la proteína purificada (peso molecular teórico de 17,5 kDa) (**Figura 30B**). La diferencia existente entre el peso estimado a partir de su movilidad electroforética y su peso molecular teórico posiblemente sea debido a la presencia de PTMs en la proteína. A parte de la banda mayoría, en la muestra de proteína purificada también se pueden distinguir bandas proteicas con masas moleculares aproximadas de 44, 66, 110 y 154 kDa también reconocidas por ambos sueros. El incremento regular del peso molecular de estas bandas sugiere

la existencia de formas oligoméricas altamente estables de la proteína FVP5, correspondientes posiblemente a dímeros, trímeros, pentámeros y heptámeros, en las muestras de proteína purificada.

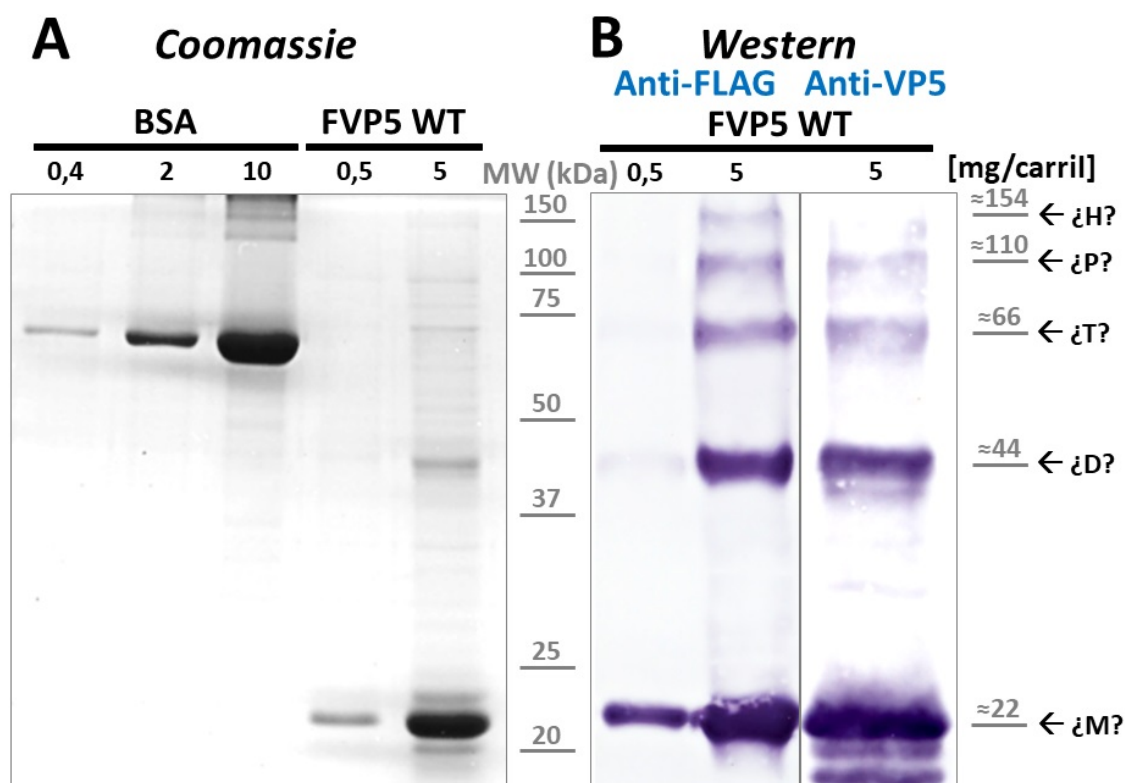


Figura 30. Purificación de la proteína FVP5 expresada en *E. coli*. Resultado de la purificación mediante cromatografía de afinidad de la proteína FVP5 expresada en *E. coli*. **A)** Muestra de proteína FVP5 obtenida tras el proceso de purificación y concentración (≈5 mg/ml), analizada mediante SDS-PAGE seguido por tinción con azul de Coomassie. A su izquierda presenta un patrón de proteína BSA diluida a concentraciones conocidas (0,4, 2 y 10 mg/ml). **B)** Western blots anti-FLAG y anti-VP5 de la misma muestra de proteína FVP5 purificada y concentrada.

Como controles para estos experimentos, se emplearon las proteínas FVP5 Δ 15CT, que carece del dominio policatiónico C-terminal; y FVP5CTM1, que contiene un conjunto de mutaciones que elimina completamente la carga electropositiva de su dominio C-terminal. Ambas proteínas fueron expresadas, purificadas, concentradas y caracterizadas de forma similar a lo descrito para la proteína FVP5 (**Figura 31A**). Las proteínas purificadas fueron empleadas para la realización de ensayos de unión a matrices lipídicas. Estas matrices contienen, de forma individualizada, un conjunto de los lípidos biológicamente relevantes presentes en la cara citosólica de diferentes compartimentos membranosos celulares. Entre los lípidos analizados se incluyen PI y sus siete derivados PIP, ácido lisofosfatídico (LPA), lisofosfocolina (LOC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC), esfingosina 1-fostafo (S1P), ácido fosfatídico (PA) y fosfatidilserina (PS) ([van Meer et al., 2008](#)).

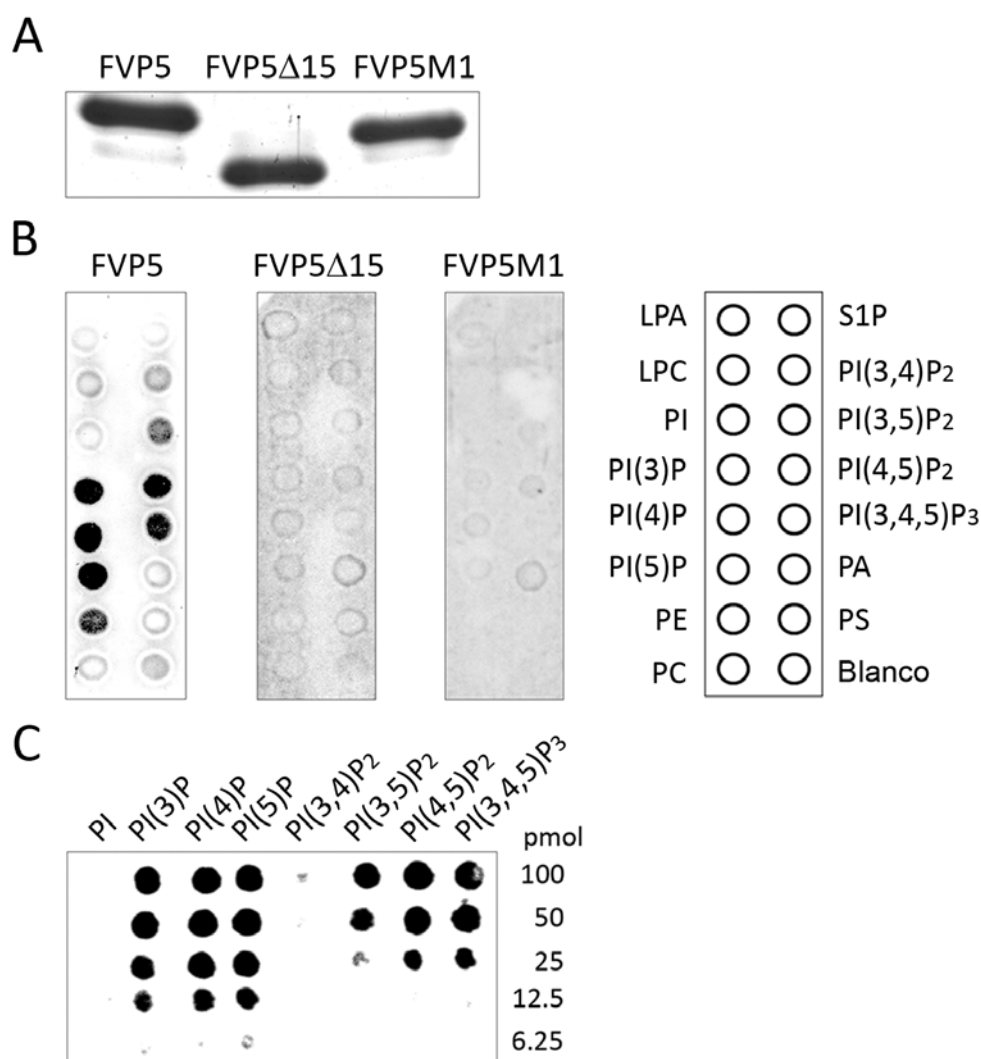


Figura 31. Contribución del extremo C-terminal en la interacción de la proteína VP5 con PIPs. **A)** Las proteínas FVP5 WT, FVP5Δ15CT y FVP5CTM1 expresadas en *E. coli* fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad. Las muestras resultantes fueron analizadas mediante SDS-PAGE seguido por tinción con azul de Coomassie. **B)** Ensayos de unión a lípidos. Matrices lipídicas conteniendo 100 pmol/punto de diferentes lípidos fueron incubadas con preparaciones (5 μg/ml) de las diferentes proteínas bajo análisis. Posteriormente las matrices fueron incubadas con un mAb anti-FLAG de ratón, seguido por una incubación con un anticuerpo anti-IgG de ratón de unido a peroxidasa. Finalmente las matrices fueron reveladas mediante quimioluminiscencia. El panel de la derecha indica la posición de los diferentes lípidos en la matriz empleada. PA, ácido fosfatídico; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; PI, fosfatidilinositol; PI(3)P, PI(3) fosfato; PI(4)P, PI(4) fosfato; PI(5)P, PI(5) fosfato; PI(3,4)P₂, PI(3,4) bifosfato; PI(3,5)P₂, PI(3,5) bifosfato; PI(4,5)P₂, PI(4,5) bifosfato; PI(3,4,5)P₃, PI(3,4,5) trifosfato; PS, fosfatidilserina; S1P, esfingosina-1-fosfato. **C)** Unión de la proteína FVP5 a diferentes PIPs. El ensayo se realizó siguiendo la metodología descrita en (B) empleando una matriz conteniendo concentraciones decrecientes de los diferentes PIPs. Se indica la cantidad/punto de cada uno de los PIPs.

Como se muestra en la **Figura 31B**, los ensayos revelaron la interacción de la proteína FVP5 con las tres especies de PIP monofosfato (PI(3)P, PI(4)P y PI(5)P). También se detectó unión con PI(4,5)P₂ y PI(3,4,5)P₃, aunque algo menos eficiente en estos casos. Por último, se detectó una señal de unión mucho más débil con PI(3,5)P₂ y PE. Sorprendentemente, no se detectó interacción de FVP5 con PI(3,4)P₂. En el caso de las proteínas control FVP5Δ15 y FVP5CTM1, no se observó

interacción con ninguno de los lípidos analizados. Los resultados obtenidos demuestran de forma taxativa la importancia del dominio policatiónico C-terminal para el establecimiento de la interacción entre la proteína VP5 y diferentes PIPs. Esta región de la proteína será descrita de ahora en adelante como el dominio de unión a PIPs.

Con el fin de evaluar de forma cuantitativa la afinidad de la proteína FVP5 por las distintas especies de PIPs, se realizaron nuevos ensayos empleando matrices lipídicas conteniendo cantidades decrecientes de los distintos PIPs (100-6.25 pmol/punto). Como se observa en la **Figura 31C**, FVP5 exhibe una elevada afinidad por las tres especies de PIP monofosfato, dando lugar a señales significativas en concentraciones de 12,5 pmoles/punto de estos lípidos. En contraste, solo se detectaron niveles significativos de interacción a PI(4,5)P₂ o PI(3,4,5)P₃ a concentraciones superiores (≥ 25 pmoles/punto). De acuerdo a los resultados obtenidos, la afinidad de FVP5 por PI(3,5)P₂ es aún menor, requiriendo concentraciones superiores a 50 pmoles/punto para la obtención de una señal de interacción significativa. Como era de esperar atendiendo a los resultados descritos anteriormente, no se detectó interacción con PI ni con PI(3,4)P₂. Estos resultados indican que la proteína VP5 muestra una afinidad preferencial por los derivados monofosfato de PI.

2.4. Determinación del papel funcional del dominio de unión a PIPs de la proteína VP5 en la infección por IBDV

La caracterización del papel del dominio de unión a PIPs descrita anteriormente se realizó empleando versiones recombinantes de la proteína VP5 expresadas en *E. coli*. Por ello, se consideró necesario estudiar el efecto de mutaciones específicas en este dominio introducidas en el contexto del genoma viral. Para la realización de este estudio, se generaron tres mutantes de IBDV mediante genética reversa, denominados IBDV-VP5 Δ 3CT, IBDV-VP5 Δ 10CT y IBDV-VP5 Δ 14CT. Estos virus expresan versiones truncadas de la proteína VP5, carentes de los 3, 10 y 14 aminoácidos C-terminales de la proteína, respectivamente. Es importante indicar que las sustituciones nucleotídicas introducidas en el segmento A del genoma viral, necesarios para generar los codones de terminación en la región 3' del ORF de la proteína VP5, no alteran la secuencia de la poliproteína codificada por el ORF A2 que, como se ha descrito anteriormente, se encuentra parcialmente solapado al ORF A1. Como controles para los subsiguientes experimentos se emplearon los virus IBDV-WT e IBDV-VP5-KO, descritos anteriormente. En la **Figura 32A** se muestra un diagrama con la configuración del extremo C-terminal de la proteína VP5 expresada por los distintos mutantes descritos.

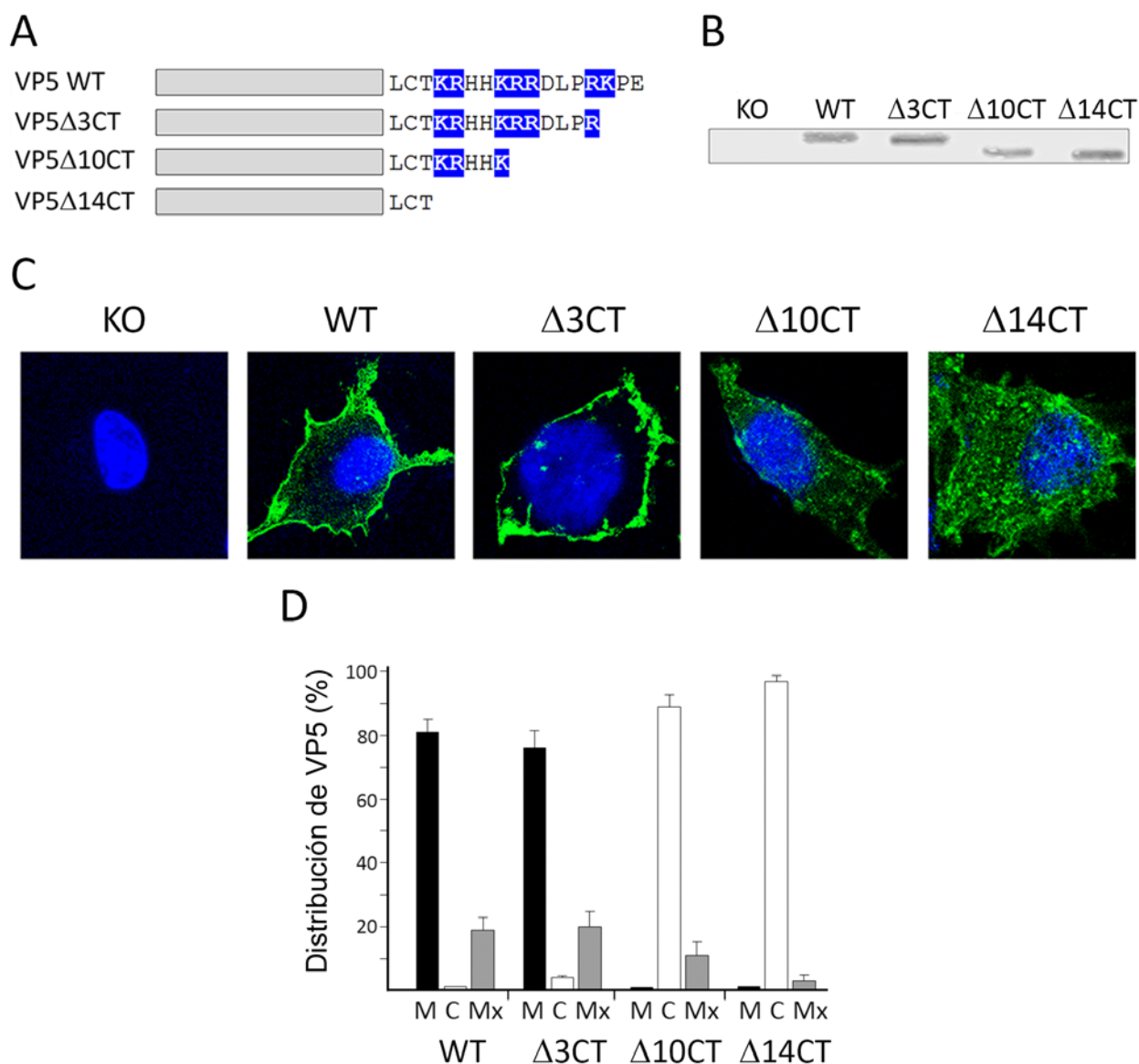


Figura 32. Efecto de la delección del dominio de unión a PIPs en la localización subcelular de la proteína VP5 en células infectadas por IBDV. A) El diagrama representa la configuración del extremo C-terminal de la proteína VP5 expresada por los distintos virus empleamos en este análisis (WT, Δ3CT, Δ10CT y Δ14CT). Los aminoácidos electropositivos localizados en el extremo C-terminal están indicados en azul. **B)** Expresión de las diferentes proteínas analizadas. Extractos de células DF-1 infectadas con los diferentes virus bajo estudio fueron analizadas mediante Western blotting empleando suero anti-VP5. **C)** Distribución subcelular de las diferentes versiones de la proteína VP5. Imágenes de células individuales. Los cubreobjetos conteniendo las células DF-1 infectadas con los diferentes virus fueron procesados para IF usando un suero anti-VP5 de conejo seguido por incubación con anticuerpo anti-IgG de conejo unido a Alexa-488 (Verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Azul). Las células fueron visualizadas mediante CLSM. Las señales fluorescentes fueron recogidas por separado usando los filtros apropiados. Las imágenes presentadas se corresponden a secciones confocales que muestran la superposición de las dos señales fluorescentes, y son ejemplos característicos de la inmunofluorescencia específica de VP5 observada en células infectadas con los distintos virus. **D)** Análisis estadístico. Las células que muestran más del 70% del total de la señal frente a VP5 en la PM o en el citoplasma celular fueron atribuidas a los grupos P o C, respectivamente. El resto de células, que presentaba una distribución mixta PM/citoplasma, fue incluido en el grupo Mx. El análisis fue realizado a partir de datos recogidos en tres experimentos independientes usando un total de más de 300 imágenes de células individuales. La gráfica muestra el tamaño de las diferentes poblaciones celulares observadas en cultivos infectados con los diferentes virus.

El análisis de la expresión y distribución subcelular de las diferentes versiones de la proteína VP5, se realizó mediante infección (MOI=3) de cultivos de células DF-1 con los correspondientes virus bajo análisis. A las 24 h p.i., los cultivos fueron recogidos para analizar mediante *Western blotting* la expresión de las diferentes versiones de la proteína VP5 o fijados y procesados para inmunofluorescencia empleando suero anti-VP5. Como se observa en la **Figura 32B**, las diferentes versiones de VP5 presentan ligeras variaciones en su movilidad electroforética, esperables atendiendo a las diferencias en la secuencia primaria de cada una de ellas. Sin embargo, las bandas específicas de proteína VP5 detectadas muestran intensidades relativas similares, indicando que las mutaciones introducidas no afectan de forma significativa al nivel de expresión de la proteína. Como era esperable, no se detectó expresión de la proteína VP5 en las células infectadas con el virus IBDV-VP5-KO.

Como se muestra en las **Figura 32C** y **Figura 32D**, la proteína VP5 sintetizada en las células infectadas con el virus control IBDV-WT se localiza mayoritariamente en PM. La proteína codificada por IBDV-VP5 Δ 3CT se acumula predominantemente en PM, mostrando un comportamiento similar al de la proteína VP5 completa. Por el contrario, las proteínas codificadas por los virus IBDV-VP5 Δ 10CT e IBDV-VP5 Δ 14CT exhiben una localización mayoritariamente citosólica. Los resultados de estos experimentos son coherentes con los obtenidos tras la expresión de las proteínas recombinantes FVP5, FVP5 Δ 5CT, FVP5 Δ 10CT y FVP5 Δ 15CT en un contexto heterólogo (**Figura 28**). Estos resultados confirman el papel crítico del dominio de unión a PIPs en la localización subcelular de la proteína VP5 en el contexto de la infección por IBDV.

2.5. Determinación del papel del dominio de unión a PIPs de la proteína VP5 sobre la capacidad de diseminación célula a célula de IBDV y en la producción de virus extracelular

Con el fin de determinar la posible existencia de una relación directa entre la localización subcelular de la proteína VP5 y su papel clave en el proceso de diseminación célula a célula de IBDV, se realizaron una serie de experimentos empleando los virus descritos en el apartado anterior. En primer lugar se analizó el efecto de las diferentes delecciones introducidas en el extremo C-terminal de la proteína sobre el tamaño de placa de lisis de cada uno de los virus mutantes. Para ello, se infectaron cultivos de células QM7 con diluciones seriadas de los virus IBDV-VP5 Δ 3CT, IBDV-VP5 Δ 10CT e IBDV-VP5 Δ 14CT. Como controles se emplearon los virus IBDV-WT e IBDV-VP5-KO. A las 72 h p.i., las monocapas fueron procesadas para visualizar las placas de lisis de acuerdo al protocolo descrito anteriormente.

Como se ha descrito anteriormente (**Figura 19**), las placas de lisis generadas por el virus IBDV-VP5-KO presentan un diámetro medio extremadamente más pequeño que el producido por la infección con el virus IBDV-WT. Por otro lado, los tres mutantes de IBDV que presentan distintas versiones de la proteína VP5 con deleciones que afectan al dominio de unión a PIPs truncándolo a distintos niveles, exhiben reducciones notables (entre 1,7 y 3,1 veces) (**Figura 33A**) con respecto al observado en cultivos infectados con el virus IBDV-WT. Como era de esperar, el diámetro medio de las placas de lisis disminuye de forma inversa al tamaño de la deleción introducida en el extremo C-terminal de la proteína. El análisis estadístico de los datos obtenidos muestra que la reducción del tamaño de las placas de lisis detectadas en cultivos infectados con los mutantes IBDV-VP5 Δ 10CT e IBDV-VP5 Δ 14CT, es estadísticamente significativo ($p < 0.001$) con respecto al tamaño de placa del virus IBDV-WT (**Figura 33B**). Estos resultados indican que la interacción de VP5 con la PM es crítica para que la proteína pueda ejercer su función.

Es importante indicar que a pesar del origen clonal de los virus usados en nuestros análisis, se observó la presencia de una fracción de placas de lisis anormalmente pequeñas (≤ 5 veces inferior al tamaño medio) en todos los virus analizados. Por otra parte, los ensayos de placa realizados con clones del virus IBDV-WT aislados tanto a partir de placas de diámetro medio como de placas anormalmente pequeñas dieron lugar a la formación de ambas poblaciones de placa descritas (datos no mostrados), lo que ha impedido determinar el origen de esta heterogeneidad.

Con el fin de determinar el efecto de las deleciones en el extremo C-terminal de la proteína sobre la capacidad de liberación de virus, se analizó la producción de virus extracelular en cultivos de células QM7 infectados a alta multiplicidad ($\text{MOI}=3$) con los diferentes virus bajo estudio. Para ello, se recogió y tituló el medio extracelular de cultivos infectados con cada uno de los virus analizados a las 8, 12 y 24 h p.i. Como se muestra en la **Figura 33C**, los tres virus mutantes presentan disminuciones significativas en la producción de virus extracelular. En concordancia con los datos del análisis del tamaño de placa, esta reducción es más pronunciada cuanto mayor es el tamaño de la deleción en el extremo C-terminal de la proteína, llegando a obtener en el caso de IBDV-VP5 Δ 14CT títulos de virus a las 24 h p.i. prácticamente idénticos a los obtenidos con IBDV-VP5-KO.

Estos resultados permiten concluir que la eliminación del dominio de unión a PIPs de la proteína VP5 afecta significativamente a la capacidad de diseminación célula a célula del virus, y por tanto, a la producción de virus extracelular en cultivos celulares.

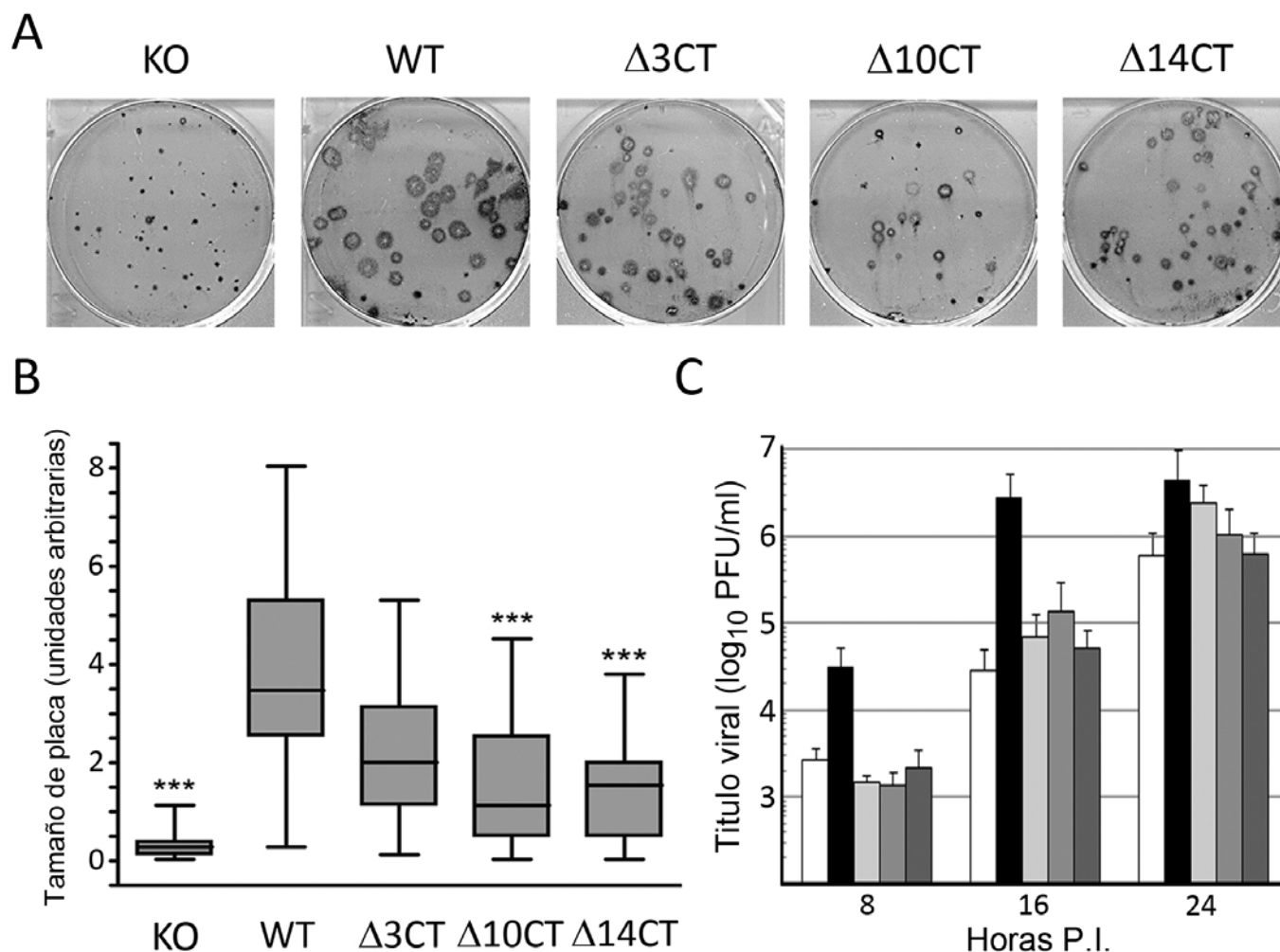


Figura 33. Efecto de la delección del dominio de unión a PIPs de la proteína VP5 sobre el tamaño de placa de lisis y en la producción de virus extracelular. A) Ensayo de placa. Cultivos de células QM7 fueron infectadas con los virus IBDV-WT (WT), IBDV-KO (KO), IBDV-VP5 $\Delta 3CT$ ($\Delta 3CT$), IBDV-VP5 $\Delta 10CT$ ($\Delta 10CT$) e IBDV-VP5 $\Delta 14CT$ ($\Delta 14CT$). Tras la infección, las monocapas celulares fueron mantenidas en medio semisólido durante 72 h. A continuación, el medio fue retirado y las placas de lisis producidas por los diferentes virus fueron reveladas mediante inmunotinción usando un suero anti- VP2. **B)** Análisis estadístico. El análisis de los datos obtenidos fue realizado empleando imágenes de las monocapas inmunoteñidas usando el programa Graphad Prism 4.0. Se realizó un test Kruskal-Wallis seguido por un test de comparaciones múltiples de Dunn entre las áreas de las placas de lisis detectadas en monocapas infectadas con los diferentes virus mutantes, frente a las generadas por IBDV-WT. Los datos presentados corresponden a tres experimentos independientes, totalizando un mínimo de 750 placas de lisis seleccionadas aleatoriamente para cada virus. Las diferencias significativas ($p < 0.001$) están indicadas con asteriscos (***). **C)** Producción de virus extracelular. Cultivos de células QM7 fueron infectadas a alta multiplicidad (MOI=3) con IBDV-VP5-KO (columna blanca), IBDV-WT (negro), IBDV-VP5 $\Delta 3CT$ (gris claro), IBDV-VP5 $\Delta 10CT$ (gris medio) e IBDV-VP5 $\Delta 14CT$ (gris oscuro). A las 8, 16 y 24 h p.i., el medio de cultivo fue recogido y sometido a centrifugación a 15.000xg durante 15 min para eliminar células y residuos de gran tamaño. Los sobrenadantes correspondientes fueron empleados para determinar el título de virus extracelular. Los datos presentados corresponden a tres experimentos independientes.

Discusión

Como señala el título de una excelente revisión sobre IBD publicada hace pocos años ([Ingrao et al., 2013](#)), la bursitis infecciosa es el resultado de una compleja interacción entre IBDV y su hospedador. El conocimiento en profundidad de las bases moleculares de la interacción virus-célula constituye la vía más eficaz para lograr mejoras sustanciales en el control de la enfermedad. Sin embargo, aunque se han conseguido grandes avances en el conocimiento de la estructura, la biología molecular y la estrategia de replicación viral, aún existe un importante vacío de conocimiento acerca de bases moleculares que subyacen a la patogénesis inducida por IBDV.

Como se ha mencionado anteriormente, el arsenal proteico de IBDV es muy limitado, codificando únicamente cinco proteínas maduras. La mayor parte de los estudios realizados hasta la fecha se han centrado en la caracterización molecular y estructural de las proteínas estructurales del virus (VP1, VP2 y VP3). Sin embargo, y a pesar de que la información disponible demuestra fehacientemente que la proteína VP5 juega un papel central en la patología inducida por IBDV ([Mundt et al., 1997](#), [Yao et al., 1998](#), [Wu et al., 2009](#), [Qin et al., 2010](#)), su estudio ha recibido una atención marginal. El presente trabajo se ha centrado en la realización de un análisis sistemático acerca de esta proteína, en un intento de aportar datos experimentales que permitan establecer su función durante el ciclo replicativo del virus y su posible relación en la interacción con la célula hospedadora.

1. REGULACIÓN TEMPORAL DE LA EXPRESIÓN Y CONTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA VP5 DURANTE EL CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL

La proteína VP5 está codificada por el ORF A1, el cual se encuentra parcialmente solapado con el ORF A2, que a su vez codifica la poliproteína viral, ambos presentes en el segmento genómico A. La transcripción de este segmento da lugar a la síntesis de mRNAs bicistrónicos ([Spies et al., 1989](#)). Sin embargo, el mecanismo(s) que regula la traducción de ambos ORFs es aún desconocido.

En el año 1997 se presentaron los primeros datos experimentales que describían la expresión de la proteína VP5 en células infectadas con IBDV ([Mundt et al., 1997](#)). Basándose en los resultados de un ensayo de inmunoprecipitación realizado a partir de muestras recogidas durante un periodo de seis horas desde el inicio de la infección, los autores de este trabajo concluyeron que la expresión temporal de la proteína VP5 podría diferir de la del resto de proteínas codificadas por el virus, expresándose de forma transitoria únicamente durante los primeros estadios del ciclo replicativo viral. Esta hipótesis sugería a su vez la existencia de un posible mecanismo de supresión

selectiva de la traducción del ORF A1, así como la posibilidad de que la proteína VP5 pudiera jugar un papel transitorio durante la etapa inicial de la replicación viral. Nuestros resultados muestran de forma concluyente que la cinética de acumulación de la proteína VP5 en células infectadas es similar al de la proteína estructural VP3, codificada por el ORF A2, indicando que la traducción de los ORFs A1 y A2 se mantiene a lo largo del ciclo replicativo de IBDV. Estos resultados refutan la hipótesis previa propuesta por Mundt et al (1997) en relación con una posible expresión transitoria de la proteína VP5.

Ninguno de los estudios anteriores aportaba información específica acerca de la posible contribución de esta proteína al desarrollo de procesos elementales del ciclo replicativo viral tales como la transcripción y replicación del genoma, la traducción de los mRNAs virales y el ensamblaje de la progenie. En este trabajo se ha realizado un análisis comparativo de estos procesos en cultivos infectados con los virus IBDV-WT e IBDV VP5-KO, este último carente del ORF correspondiente a la proteína VP5. Los datos experimentales presentados en el presente trabajo demuestran por primera vez que la expresión de la proteína VP5 es irrelevante para el correcto funcionamiento de los procesos descritos. En concordancia con esta observación, nuestro trabajo demuestra de forma fehaciente que la eliminación de la expresión de esta proteína no afecta al rendimiento en la producción de virus intracelular.

Uno de los aspectos más controvertidos acerca del papel de la proteína VP5 es su posible relación con la respuesta apoptótica en células infectadas. Mientras algunas publicaciones sugieren una actividad proapoptótica (Yao et al., 1998, Li et al., 2012), otras apoyan un papel completamente opuesto, proponiendo que esta proteína juega un papel esencial en el control de la respuesta apoptótica inducida por la infección con IBDV (Liu and Vakharia, 2006, Wei et al., 2011). Los datos presentados en este trabajo, obtenidos mediante análisis en tiempo real de muerte celular en cultivos infectados con los virus IBDV-WT e IBDV-VP5-KO, demuestran que las cinéticas de muerte celular en ambos casos son prácticamente indistinguibles, lo que apoya de forma sólida la irrelevancia de la proteína VP5 tanto en la inducción como en el posible control de procesos de muerte celular programada durante la infección por IBDV.

2. LIBERACIÓN NO LÍTICA DE IBDV

Nuestros datos experimentales muestran que aunque la eliminación de la proteína VP5 no afecta ni al proceso de replicación ni a la acumulación de virus intracelular, sin embargo si tiene un efecto muy significativo sobre el rendimiento en la producción de virus extracelular. Los resultados

obtenidos en infecciones paralelas realizadas con los virus IBDV-WT e IBDV-KO, permitieron observar la existencia tanto de un retraso, no inferior a seis horas, como de una reducción significativa en el nivel de producción de virus extracelular del 99% a las 16 h, y aproximadamente el 90% a las 24 h p.i., en cultivos infectados con el virus carente de la proteína VP5. Además, la máxima de producción de virus extracelular en cultivos infectados con el virus IBDV-WT, se alcanza durante el periodo comprendido entre las 8 y 16 h p.i., un lapso temporal que coincide con la máxima actividad metabólica viral (síntesis de RNA y proteínas virales) y con niveles basales de muerte celular ($\leq 8\%$). En contraposición, la máxima acumulación de virus celular en cultivos infectados con el virus carente de la proteína VP5, IBDV-VP5-KO, se detecta de forma tardía, entre las 16 y 24 h p.i., coincidiendo con un rápido incremento de la tasa de muerte celular inducida por la replicación viral.

Es importante resaltar las considerables diferencias detectadas entre los títulos de virus infectivo intra- y extracelular (>2 unidades logarítmicas) en cultivos infectados con el virus IBDV-WT. Aunque la causa de esta diferencia no ha sido investigada de forma sistemática, se pueden proponer dos posibles explicaciones para este fenómeno. Por un lado, parece posible que una fracción sustancial de las partículas liberadas durante el proceso de lisis podrían corresponder a partículas inmaduras, incapaces de iniciar una infección productiva. Por otro lado, una explicación complementaria o alternativa podría tener relación con la formación PVAs en el interior de la célula infectada. Los PVAs son superestructuras altamente ordenadas y estables que albergan una gran cantidad de partículas virales. La estabilidad de estas superestructuras podría afectar de forma drástica a la relación entre el número de partículas físicas y el de partículas infectivas en las muestras empleadas para la titulación de virus intracelular. Aunque el mecanismo molecular responsable tanto del ensamblaje como de la estabilidad de los PVAs ha sido descrito de forma precisa ([Garriga et al., 2006](#)), el papel biológico de estas superestructuras es desconocido. Sin embargo, es tentador especular acerca de la posibilidad de que los PVAs ensamblados durante la infección con IBDV estén implicados en la transmisión horizontal del virus, jugando un papel funcional similar al de los cuerpos de oclusión producidos durante el ciclo de replicación de algunos virus como los miembros de la familia *Baculoviridae* ([Cory and Myers, 2003](#)).

La demostración formal de que IBDV emplea un mecanismo de liberación no lítico requiere de pruebas directas obtenidas a nivel de célula individual. Este difícil reto fue reciente y elegantemente solventado por Bird y colaboradores, mediante la realización de análisis en tiempo real de células infectadas con un poliovirus recombinante que expresa y encapsida de forma

constitutiva la proteína fluorescente GFP (Bird et al., 2014). Desafortunadamente, todos nuestros intentos para generar IBDV recombinantes capaces de expresar marcadores heterólogos han resultado infructuosos. En vista de esta importante limitación experimental, la caracterización de la cinética de liberación y diseminación viral se realizó mediante ensayos de inmunofluorescencia en cultivos infectados a baja MOI mantenidos en medio semisólido a fin de retardar la posible difusión de las partículas virales. Esta aproximación nos permitió detectar la presencia de punteados inmunofluorescentes característicos, correspondientes a la proteína estructural VP2, en el entorno cercano de las células infectadas por el virus IBDV-WT, que en nuestra interpretación se debe a la presencia de partículas virales recién egresadas. Esta observación se realizó a las 16 h p.i., un periodo temporal que coincide con la máxima actividad metabólica viral. Por otro parte, es importante resaltar que las células analizadas no presentaban alteraciones citopáticas inducidas, lo que excluye la posibilidad de que la liberación del virus pudiera estar directamente asociada a la lisis de las células analizadas. El estudio paralelo realizado con el virus IBDV-VP5-KO, además de confirmar que en ausencia de la proteína VP5 la diseminación del virus se ralentiza de forma muy significativa, reveló la ausencia de estos punteados inmunofluorescentes característicos en el entorno espacial de las células infectadas a tiempos p.i. tempranos, observándose que la señal fluorescente correspondiente a la proteína VP2 permanece establemente confinada a las células infectadas hasta las 36-48 h p.i.

El análisis ultraestructural de las células infectadas por IBDV reveló la presencia de dos estructuras no descritas previamente y que probablemente comparten un origen común. Por un lado se detectó la presencia de PVAs envueltos por membranas simples. Aunque previamente se había documentado de forma exhaustiva la presencia de PVAs en el citoplasma de células infectadas por IBDV, nunca antes se había detectado la presencia de una estructura membranosa delimitando su periferia. Por otra parte, se observó la existencia de lo que parece ser una compleja red túbulo-vesicular, formada por VCVs albergando un gran número de partículas virales en el citoplasma de las células infectadas. Ambas estructuras fueron detectadas exclusivamente en células infectadas con el virus IBDV-WT. Es importante señalar, que ambas estructuras también fueron detectadas en células DF1 infectadas por IBDV-WT, indicando que su formación es independiente del sistema celular donde se produce la replicación del virus.

Las imágenes de TEM sugieren que las VCVs podrían estar interconectadas con las PVAs, y que el tráfico de partículas de IBDV a lo largo de esta hipotética red túbulo-vesicular se extendería a través del citoplasma celular. De igual manera, las imágenes de TEM sugieren que las VCVs

podrían actuar como vesículas exocíticas, que al fusionarse con la PM facilitarían la liberación de la carga viral al espacio extracelular. Estos resultados plantean importantes cuestiones biológicas relativas tanto al origen de las membranas detectadas, como a la posible implicación de la proteína VP5 en su biogénesis y/o reclutamiento. Posiblemente, la realización de futuros análisis tomográficos y el uso de tratamientos farmacológicos proporcionarían respuestas a estas preguntas permitiendo obtener una mejor comprensión acerca del origen y el papel funcional de las estructuras descritas.

Existe una percepción generalizada de que la liberación de la progenie producida por virus carentes de envuelta lipídica se produce de forma exclusiva a través de la lisis de la célula infectada. Sin embargo, durante los últimos años se ha demostrado que virus desnudos pertenecientes a diversas familias, incluidos adenovirus, poliomavirus y picornavirus, emplean mecanismos específicos que facilitan su liberación antes de que se produzca la destrucción de la PM de la célula hospedadora ([Lemon, 1985](#), [Roussarie et al., 2007](#), [Paloheimo et al., 2011](#), [Feng et al., 2013](#), [Bird et al., 2014](#)). En una reciente revisión, Birs y Kirkegaard describen tres mecanismos alternativos para la liberación no lítica de virus desnudos ([Bird and Kirkegaard, 2015](#)). El primero consiste en la liberación directa (*blebbing*) de las partículas a través de la PM. En el análisis ultraestructural de las células infectadas, con IBDV, no se observó la presencia de partículas virales “libres” en la cercanía de la PM, lo cual constituye una fuerte evidencia en contra de la posible utilización de este mecanismo por parte de IBDV. Las dos alternativas restantes se basan en la subversión de las principales rutas de reciclaje celular, los cuerpos multivesiculares (MVBs) y la ruta autofágica, que involucran la biogénesis de vesículas exocíticas implicadas en la liberación del contenido citoplasmático al medio extracelular a partir de células intactas ([Parzych and Klionsky, 2014](#)).

Nuestros resultados han mostrado que la proteína VP5 se une específicamente a diferentes PIPs, incluyendo PI(3)P. Investigaciones previas de otros laboratorios han demostrado que VP5 interactúa con la subunidad reguladora p85 α de la PI3K ([Wei et al., 2011](#)). Estas observaciones sugieren que la proteína VP5 podría interferir con la señalización mediada por PIPs, en particular por PI(3)P, una molécula clave en la regulación tanto de los MVBs y de la ruta autofágica ([Balla, 2013](#)). Las factorías de IBDV parecen estar asociadas a membranas de compartimentos endosomales ([Delgui et al., 2013](#)), lo que abre la posibilidad de que el virus secuestre MVBs para la liberación de su progenie, aunque en este momento es difícil predecir el mecanismo(s) que permitiría la incorporación de partículas IBDV al lumen de vesículas endocíticas. Con respecto a la

ruta autofágica, se ha publicado recientemente que la interacción de partículas de IBDV con uno de sus receptores, la proteína de choque térmico de 90 kDa, familia α , clase A, miembro 1 (HSP90AA1), provoca la inactivación de la ruta de AKT-mTOR. Esta interacción desencadena una respuesta autofágica transitoria en las células infectadas (Hu et al., 2015). Esta observación podría sustentar la posibilidad de que IBDV posea la capacidad de subvertir la ruta autofágica con el fin de promover la liberación de las partículas infectivas.

Tomados en conjunto, los datos experimentales presentados indican que IBDV utiliza al menos dos mecanismos de liberación. El primero de ellos, dependiente de la expresión de VP5, es responsable de la salida de partículas infecciosas durante el periodo de máxima actividad replicativa viral, lo cual facilitaría una rápida diseminación del virus. La eliminación selectiva de este mecanismo, provocada por el bloqueo de la expresión de la proteína VP5, podría explicar la fuerte atenuación observada con mutantes carentes de esta proteína. El segundo mecanismo, asociado a la lisis celular durante la etapa final de la infección, es responsable de la liberación del resto de la progenie viral. Como ocurre en otros procesos celulares que involucran el funcionamiento de vías de señalización complejas, la muerte celular inducida por el virus se encuentra sujeta a un alto grado de variabilidad célula-célula (Atay and Skotheim, 2014), por lo que es esperable el solapamiento temporal de ambos mecanismos cuando los análisis se realizan a nivel poblacional.

Como se describió anteriormente, la incorporación del ORF de VP5 al repertorio genético de los birnavirus fue un evento tardío en la evolución de los birnavirus (Rancurel et al., 2009). Es importante reseñar que algunos birnavirus, específicamente aquellos pertenecientes a los géneros *Blosnavirus* y *Entomobirnavirus*, no portan este elemento genético. Es interesante reseñar que los miembros de estos dos géneros contienen ORFs solapados en la región central del ORF que codifica la poliproteína (Da Costa et al., 2003). Sería interesante determinar si estas ORFs codifican proteínas con un papel funcional similar a la de la proteína VP5 de IBDV.

3. BASES MOLECULARES DEL TROPISMO MEMBRANAL DE LA PROTEÍNA VP5

Aunque inicialmente se sugirió la posibilidad de que la proteína VP5 podría comportarse como una proteína integral de membrana de tipo II (Lombardo et al., 2000), análisis subsiguientes realizados con algoritmos más avanzados descartaron esta posibilidad. Sin embargo, el análisis de la secuencia primaria de la proteína reveló la presencia de un dominio policationico en su extremo C-terminal. Como se ha descrito anteriormente, numerosas proteínas celulares se asocian a la PM

a través de interacciones electrostáticas entre dominios policationicos con lípidos aniónicos relativamente abundantes en la cara citosólica de diferentes compartimentos membranales ([van Meer et al., 2008](#)). Los resultados presentados en este trabajo demuestran de forma taxativa que la presencia de tres grupos de residuos electropositivos ($^{132}\text{KR}^{133}$, $^{136}\text{KRR}^{138}$ and $^{142}\text{RK}^{143}$) en la región C-terminal de VP5 juega un papel esencial en el tropismo membranal de la proteína. Los ensayos realizados con la proteína GFP fusionada a los 24 aminoácidos C-terminales de VP5 (GFP/CT122-145) muestran que esta región es suficiente para modificar el tropismo subcelular de GFP, convirtiéndola en una proteína con un fuerte tropismo membranal. Por otra parte, los datos recogidos con versiones recombinantes de la proteína VP5 fusionadas al epítipo FLAG, albergando tanto deleciones como mutaciones de sustitución en el extremo C-terminal policationico de VP5, evidencian que la reducción o eliminación total de la carga neta electropositiva de este dominio afecta directamente al tropismo de la proteína, reduciendo o eliminando completamente su interacción con la PM. Resultados similares fueron obtenidos en células infectadas con mutantes de IBDV que expresan diferentes deleciones de distinto tamaño en el extremo C-terminal de la proteína. Tomados en conjunto, los resultados presentados demuestran que el dominio C-terminal policationico de VP5 es necesario y suficiente para promover la interacción de la proteína con la PM.

En consonancia con su importante papel funcional, esta región de la proteína presenta un elevado nivel de conservación en todas las cepas virales analizadas. Es interesante resaltar que la comparación de la secuencia de la proteína VP5 de cepas de IBDV que presentan diferentes niveles de virulencia, muestra la existencia de una única sustitución aminoacídica conservada, $\text{R}^{133} \rightarrow \text{W}$, que diferencia las cepas CV de las cepas VV del serotipo I ([Hernandez et al., 2010](#)). Esta mutación se encuentra en el primer grupo electropositivo del dominio policationico C-terminal. Por lo tanto, la presencia de esta sustitución aminoacídica merece que en el futuro se realice un análisis detallado de su efecto potencial sobre la distribución subcelular de la proteína, su interacción con PIPs y sobre la capacidad de diseminación del virus.

4. INTERACCIÓN ENTRE LA PROTEÍNA VP5 Y PIPs

Una vez determinado el papel fundamental que juegan las cargas positivas presentes en el dominio C-terminal de la proteína VP5 en su localización en PM, era fundamental determinar la capacidad de interacción de la proteína con lípidos de membrana. Los datos presentados en este trabajo muestran claramente que, exceptuando el $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$, la proteína VP5, a través de su cola C-

terminal policatiónica, interacciona eficientemente con todas las especies de PIPs, mostrando una especial afinidad por las tres especies monofosfato.

Como era de esperar, las distintas especies de PIPs a las que se une VP5 son especialmente abundantes en la cara citosólica de la PM. Sin embargo, aparte de la PE, reconocida débilmente por VP5, no se detectaron interacciones relevantes con otros lípidos aniónicos de membrana. Esta observación sugiere que, además de la carga neta electropositiva de esta región de la proteína, la estructura tanto del dominio de unión a PIPs como del resto de la proteína puede jugar un papel relevante en estas interacciones.

Hasta el momento, se han descrito once módulos proteicos con capacidad de unión a PIPs. La caracterización estructural y funcional de éstos ha permitido determinar que tanto la afinidad como la selectividad por las distintas especies de PIPs están determinadas por la conformación tridimensional de los citados módulos proteicos ([Kutateladze, 2010](#)). Es importante resaltar que uno de estos módulos, el denominado Fab 1, YGLO23, Vsp27, EEA1 (FYVE), está formado por la secuencia conservada (R/K)(R/K)HHCR ([Stenmark and Aasland, 1999](#)), muy similar al tramo ¹³²KRHHKR¹³⁷ del dominio de unión a PIPs de la proteína VP5 descrito en este trabajo. La futura resolución de la estructura de la proteína VP5 proporcionará información esencial para conocer con precisión el mecanismo de interacción.

Aunque los PIPs solo representan una pequeña fracción del total de los lípidos presentes en la cara citosólica de la PM y de otras membranas intracelulares ([van Meer et al., 2008](#)), éstos juegan un papel clave en gran número de funciones celulares. Entre ellas, cabe destacar su papel como precursores de segundos mensajeros en la transducción de señales, controlando una amplia variedad de vías de señalización implicadas en la supervivencia celular, en la dinámica del citoesqueleto y en el tráfico vesicular ([Balla, 2013](#)). De hecho, existen evidencias crecientes de que la modulación del metabolismo de los PIPs es un elemento crucial en la patogenicidad de algunos microorganismos intracelulares, incluyendo diferentes virus ([Lorizate and Krausslich, 2011](#), [Payraastre et al., 2012](#), [Moss, 2012](#)). En este contexto, es factible pensar que la proteína VP5 pueda subvertir alguna función(es) celular mediada por PIPs para facilitar el proceso de liberación no lítica del virus. Como se ha comentado anteriormente, se ha descrito que la proteína VP5 interactúa con la subunidad reguladora p85 α de PI3K, provocando la activación de la vía de señalización PI3K/Akt ([Wei et al., 2011](#)). Los resultados obtenidos en este trabajo son compatibles con esta observación. Es factible pensar que la proteína VP5 unida a la cara citosólica de la PM podría actuar como plataforma de unión a PI3K a través de su interacción con su subunidad p85 α .

Esta interacción proporcionaría la base estructural necesaria para activar la vía de señalización PI3K/Akt en ausencia de otros estímulos externos. Asumiendo este escenario hipotético, la selectividad de la proteína VP5 por especies monofosfato de PIPs podría restringir una posible competición por los sustratos de PI3K, facilitando de este modo la activación de esta vía.

Tomando en consideración los resultados obtenidos, es factible sugerir que la sobreexpresión de la proteína VP5 podría provocar la desregulación de vías de señalización dependientes de PIPs, incluyendo aquellas que controlan las dinámicas del citoesqueleto ([Bird et al., 2014](#)). Esta hipótesis explicaría observaciones anteriores de nuestro laboratorio que demostraban que la sobreexpresión de la proteína VP5 provoca una fuerte alteración de la morfología celular, incrementa la motilidad celular y eventualmente conduce a la lisis celular ([Lombardo et al., 2000](#)).

Conclusiones

- 1) La proteína VP5 se expresa a lo largo de todo el ciclo de replicación viral, siguiendo un patrón de expresión temporal similar al del resto de proteínas virales.
- 2) La eliminación de la proteína VP5 no afecta al funcionamiento de procesos básicos del ciclo de replicación viral (transcripción/replicación del genoma, traducción de proteínas virales y morfogénesis de la progenie). De igual manera, nuestros estudios indican que esta proteína no interviene en el fenómeno de muerte celular inducido por la replicación viral.
- 3) IBDV utiliza dos mecanismos independientes para la liberación de la progenie viral. Un mecanismo de liberación no lítico, no descrito anteriormente, dependiente de la expresión de la proteína VP5, que permite la liberación de una fracción sustancial de la progenie viral durante la fase exponencial del ciclo replicación, y un mecanismo tardío, asociado a la destrucción de la integridad celular.
- 4) El mecanismo de liberación no lítica incrementa de forma significativa la capacidad de diseminación del virus y es dependiente de la expresión de la proteína VP5.
- 5) La liberación no lítica de partículas virales de IBDV parece estar asociada a la formación de una compleja red túbulo-vesicular formada por matrices paracristalinas de virus y viriones aislados rodeados por estructuras membranosas, en el citoplasma de las células infectadas. El estudio ultraestructural realizado sugiere que la liberación no lítica de virus tiene lugar mediante la fusión de vesículas cargadas con partículas virales con la membrana plasmática de la célula infectada.
- 6) La tropismo membranal de la proteína VP5 está determinado por la interacción electrostática de su extremo C-terminal policatiónico con los fosfoinosítidos, especialmente con las formas monofosfato (PI(3)P, PI(4)P y PI(5)P), presentes en la cara interna de la membrana plasmática y otras orgánulos citoplasmáticos.
- 7) La eliminación del dominio de interacción con PIPs de la proteína VP5 provoca la inactivación del mecanismo de liberación no lítica del virus, reduciendo de forma significativa su capacidad de diseminación.

Bibliografía

- ABDUL, R., MURGIA, M. V., RODRIGUEZ-PALACIOS, A., LEE, C. W. & SAIF, Y. M. 2013. Persistence and tissue distribution of infectious bursal disease virus in experimentally infected SPF and commercial broiler chickens. *Avian Dis*, 57, 759-66.
- AHLQUIST, P. 2005. Virus evolution: fitting lifestyles to a T. *Curr Biol*, 15, R465-7.
- ARICIBASI, M., JUNG, A., HELLER, E. D. & RAUTENSCHLEIN, S. 2010. Differences in genetic background influence the induction of innate and acquired immune responses in chickens depending on the virulence of the infecting infectious bursal disease virus (IBDV) strain. *Vet Immunol Immunopathol*, 135, 79-92.
- BALTIMORE, D. 1971. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev*, 35, 235-41.
- BALLA, T. 2013. Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiol Rev*, 93, 1019-137.
- BAYLISS, C. D., SPIES, U., SHAW, K., PETERS, R. W., PAPAGEORGIOU, A., MULLER, H. & BOURSNEILL, M. E. 1990. A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. *J Gen Virol*, 71 (Pt 6), 1303-12.
- BECHT, H. 1980. Infectious bursal disease virus. *Curr Top Microbiol Immunol*, 90, 107-21.
- BERG, T. P. V. D. 2000. Acute infectious bursal disease in poultry: A review. *Avian Pathology*, 29, 175-194.
- BIRD, S. W. & KIRKEGAARD, K. 2015. Escape of non-enveloped virus from intact cells. *Virology*, 479-480, 444-9.
- BIRD, S. W., MAYNARD, N. D., COVERT, M. W. & KIRKEGAARD, K. 2014. Nonlytic viral spread enhanced by autophagy components. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 13081-6.
- BIRGHAN, C., MUNDT, E. & GORBALENYA, A. E. 2000. A non-canonical Ion proteinase lacking the ATPase domain employs the ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *EMBO J*, 19, 114-23.
- BOOT, H. J., DOKIC, K. & PEETERS, B. P. 2001. *Proc 2nd International Symposium on IBDV and CAV*. Rauischholzhausen.
- BOOT, H. J., TER HUURNE, A. A., HOEKMAN, A. J., PEETERS, B. P. & GIELKENS, A. L. 2000. Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype. *J Virol*, 74, 6701-11.
- BOTTCHER, B., KISELEV, N. A., STEL'MASHCHUK, V. Y., PEREVOZCHIKOVA, N. A., BORISOV, A. V. & CROWTHER, R. A. 1997. Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J Virol*, 71, 325-30.
- BRANDT, M., YAO, K., LIU, M., HECKERT, R. A. & VAKHARIA, V. N. 2001. Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J Virol*, 75, 11974-82.
- BROWN, M. D., GREEN, P. & SKINNER, M. A. 1994. VP2 sequences of recent European 'very virulent' isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of 'classical' strains. *J Gen Virol*, 75 (Pt 3), 675-80.
- BUSNADIEGO, I., MAESTRE, A. M., RODRIGUEZ, D. & RODRIGUEZ, J. F. 2012. The infectious bursal disease virus RNA-binding VP3 polypeptide inhibits PKR-mediated apoptosis. *PLoS One*, 7, e46768.
- CASANAS, A., NAVARRO, A., FERRER-ORTA, C., GONZALEZ, D., RODRIGUEZ, J. F. & VERDAGUER, N. 2008. Structural insights into the multifunctional protein VP3 of birnaviruses. *Structure*, 16, 29-37.
- CASTON, J. R., MARTINEZ-TORRECUADRADA, J. L., MARAVER, A., LOMBARDO, E., RODRIGUEZ, J. F., CASAL, J. I. & CARRASCOSA, J. L. 2001. C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. *J Virol*, 75, 10815-28.

- CHEVALIER, C., GALLOUX, M., POUS, J., HENRY, C., DENIS, J., DA COSTA, B., NAVAZA, J., LEPAULT, J. & DELMAS, B. 2005. Structural peptides of a nonenveloped virus are involved in assembly and membrane translocation. *J Virol*, 79, 12253-63.
- CLAROS, M. G. & VON HEIJNE, G. 1994. TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *Comput Appl Biosci*, 10, 685-6.
- COLONNA, M. 2007. TLR pathways and IFN-regulatory factors: To each its own. *European Journal of Immunology*, 37, 306-309.
- COORAY, S. 2004. The pivotal role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signal transduction in virus survival. *J Gen Virol*, 85, 1065-76.
- CORY, J. S. & MYERS, J. H. 2003. The Ecology and Evolution of Insect Baculoviruses. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34, 239-272.
- COSGROVE, A. S. 1962. An Apparently New Disease of Chickens: Avian Nephrosis. *Avian Diseases*, 6, 385-389.
- CSEZRO, M., EISENHABER, F., EISENHABER, B. & SIMON, I. 2002. On filtering false positive transmembrane protein predictions. *Protein Eng*, 15, 745-52.
- CUBAS-GAONA, L. L., DIAZ-BENEITEZ, E., CISCAR, M., RODRIGUEZ, J. F. & RODRIGUEZ, D. 2018. Exacerbated Apoptosis of Cells Infected with Infectious Bursal Disease Virus upon Exposure to Interferon Alpha. *J Virol*, 92.
- DA COSTA, B., SOIGNIER, S., CHEVALIER, C., HENRY, C., THORY, C., HUET, J. C. & DELMAS, B. 2003. Blotched snakehead virus is a new aquatic birnavirus that is slightly more related to avibirnavirus than to aquabirnavirus. *J Virol*, 77, 719-25.
- DALTON, R. M. & RODRIGUEZ, J. F. 2014. Rescue of infectious birnavirus from recombinant ribonucleoprotein complexes. *PLoS One*, 9, e87790.
- DELGUI, L., GONZALEZ, D. & RODRIGUEZ, J. F. 2009a. Infectious bursal disease virus persistently infects bursal B-lymphoid DT40 cells. *J Gen Virol*, 90, 1148-52.
- DELGUI, L., ONA, A., GUTIERREZ, S., LUQUE, D., NAVARRO, A., CASTON, J. R. & RODRIGUEZ, J. F. 2009b. The capsid protein of infectious bursal disease virus contains a functional alpha 4 beta 1 integrin ligand motif. *Virology*, 386, 360-72.
- DELGUI, L. R., RODRIGUEZ, J. F. & COLOMBO, M. I. 2013. The endosomal pathway and the Golgi complex are involved in the infectious bursal disease virus life cycle. *J Virol*, 87, 8993-9007.
- DELMAS, B., MUNDT, E., VAKHARIA, V. N. & WU, J. L. 2012. Birnaviridae. In: ADAMS, M. J., KING, A. M. Q. & LEFKOWITZ, E. (eds.) *Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. San Diego: Elsevier.
- DOBOS, P., HILL, B. J., HALLETT, R., KELLS, D. T., BECHT, H. & TENINGES, D. 1979. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J Virol*, 32, 593-605.
- ESCAFFRE, O., LE NOUEN, C., AMELOT, M., AMBROGGIO, X., OGDEN, K. M., GUIONIE, O., TOQUIN, D., MULLER, H., ISLAM, M. R. & ETERRADOSSI, N. 2013. Both genome segments contribute to the pathogenicity of very virulent infectious bursal disease virus. *J Virol*, 87, 2767-80.
- FAHEY, K. J., ERNY, K. & CROOKS, J. 1989. A conformational immunogen on VP-2 of infectious bursal disease virus that induces virus-neutralizing antibodies that passively protect chickens. *J Gen Virol*, 70 (Pt 6), 1473-81.
- FELDMAN, A. R., LEE, J., DELMAS, B. & PAETZEL, M. 2006. Crystal structure of a novel viral protease with a serine/lysine catalytic dyad mechanism. *J Mol Biol*, 358, 1378-89.
- FENG, Z., HENSLEY, L., MCKNIGHT, K. L., HU, F., MADDEN, V., PING, L., JEONG, S. H., WALKER, C., LANFORD, R. E. & LEMON, S. M. 2013. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature*, 496, 367-71.

- FERNANDEZ-ARIAS, A., RISCO, C., MARTINEZ, S., ALBAR, J. P. & RODRIGUEZ, J. F. 1998. Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *J Gen Virol*, 79 (Pt 5), 1047-54.
- GALLOUX, M., LIBERSOU, S., ALVES, I. D., MARQUANT, R., SALGADO, G. F., REZAEI, H., LEPAULT, J., DELMAS, B., BOUAZIZ, S. & MORELLET, N. 2010. NMR structure of a viral peptide inserted in artificial membranes: a view on the early steps of the birnavirus entry process. *J Biol Chem*, 285, 19409-21.
- GANDIN, V., SENFT, D., TOPISIROVIC, I. & RONAI, Z. A. 2013. RACK1 Function in Cell Motility and Protein Synthesis. *Genes Cancer*, 4, 369-77.
- GANGULY, B. & RASTOGI, S. K. 2018. Structural and functional modeling of viral protein 5 of Infectious Bursal Disease Virus. *Virus Res*, 247, 55-60.
- GAO, L., LI, K., QI, X., GAO, H., GAO, Y., QIN, L., WANG, Y., SHEN, N., KONG, X. & WANG, X. 2014. Triplet amino acids located at positions 145/146/147 of the RNA polymerase of very virulent infectious bursal disease virus contribute to viral virulence. *J Gen Virol*, 95, 888-97.
- GARDNER, H., KERRY, K., RIDDLE, M., BROUWER, S. & GLEESON, L. 1997. Poultry virus infection in Antarctic penguins. *Nature*, 387, 245.
- GARRIGA, D., NAVARRO, A., QUEROL-AUDI, J., ABAITUA, F., RODRIGUEZ, J. F. & VERDAGUER, N. 2007. Activation mechanism of a noncanonical RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 20540-5.
- GARRIGA, D., QUEROL-AUDI, J., ABAITUA, F., SAUGAR, I., POUS, J., VERDAGUER, N., CASTON, J. R. & RODRIGUEZ, J. F. 2006. The 2.6-Angstrom structure of infectious bursal disease virus-derived T=1 particles reveals new stabilizing elements of the virus capsid. *J Virol*, 80, 6895-905.
- GIAMBRONE, J. J. & CLOSSER, J. 1990. Efficacy of live vaccines against serologic subtypes of infectious bursal disease virus. *Avian Dis*, 34, 7-11.
- GIMENEZ, M. C., RODRIGUEZ AGUIRRE, J. F., COLOMBO, M. I. & DELGUI, L. R. 2015. Infectious bursal disease virus uptake involves macropinocytosis and trafficking to early endosomes in a Rab5-dependent manner. *Cell Microbiol*, 17, 988-1007.
- GOLDENBERG, N. M. & STEINBERG, B. E. 2010. Surface charge: a key determinant of protein localization and function. *Cancer Res*, 70, 1277-80.
- GRANZOW, H., BIRGHAN, C., METTENLEITER, T. C., BEYER, J., KOLLNER, B. & MUNDT, E. 1997. A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP4. *J Virol*, 71, 8879-85.
- HARLOW, E. & LANE, D. 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- HEO, W. D., INOUE, T., PARK, W. S., KIM, M. L., PARK, B. O., WANDLESS, T. J. & MEYER, T. 2006. PI(3,4,5)P3 and PI(4,5)P2 lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane. *Science*, 314, 1458-61.
- HERNANDEZ, M., VILLEGAS, P., HERNANDEZ, D., BANDA, A., MAYA, L., ROMERO, V., TOMAS, G. & PEREZ, R. 2010. Sequence variability and evolution of the terminal overlapping VP5 gene of the infectious bursal disease virus. *Virus Genes*, 41, 59-66.
- HOFMANN, K. & STOFFEL, W. 1993. TMbase-A database of membrane spanning protein segments. *Biol Chem*, 374, 166.
- HON, C. C., LAM, T. Y., DRUMMOND, A., RAMBAUT, A., LEE, Y. F., YIP, C. W., ZENG, F., LAM, P. Y., NG, P. T. & LEUNG, F. C. 2006. Phylogenetic analysis reveals a correlation between the expansion of very virulent infectious bursal disease virus and reassortment of its genome segment B. *J Virol*, 80, 8503-9.

- HU, B., ZHANG, Y., JIA, L., WU, H., FAN, C., SUN, Y., YE, C., LIAO, M. & ZHOU, J. 2015. Binding of the pathogen receptor HSP90AA1 to avibirnavirus VP2 induces autophagy by inactivating the AKT-MTOR pathway. *Autophagy*, 11, 503-15.
- INGRAO, F., RAUW, F., LAMBRECHT, B. & VAN DEN BERG, T. 2013. Infectious Bursal Disease: a complex host-pathogen interaction. *Dev Comp Immunol*, 41, 429-38.
- IRIGOYEN, N., CASTON, J. R. & RODRIGUEZ, J. F. 2012. Host proteolytic activity is necessary for infectious bursal disease virus capsid protein assembly. *J Biol Chem*, 287, 24473-82.
- IRIGOYEN, N., GARRIGA, D., NAVARRO, A., VERDAGUER, N., RODRIGUEZ, J. F. & CASTON, J. R. 2009. Autoproteolytic activity derived from the infectious bursal disease virus capsid protein. *J Biol Chem*, 284, 8064-72.
- JEON, W. J., LEE, E. K., JOH, S. J., KWON, J. H., YANG, C. B., YOON, Y. S. & CHOI, K. S. 2008. Very virulent infectious bursal disease virus isolated from wild birds in Korea: epidemiological implications. *Virus Res*, 137, 153-6.
- JUN, J. E., RUBIO, I. & ROOSE, J. P. 2013. Regulation of ras exchange factors and cellular localization of ras activation by lipid messengers in T cells. *Front Immunol*, 4, 239.
- KALL, L., KROGH, A. & SONNHAMMER, E. L. 2004. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol*, 338, 1027-36.
- KIBENGE, F. S. & DHAMA, V. 1997. Evidence that virion-associated VP1 of avibirnaviruses contains viral RNA sequences. *Arch Virol*, 142, 1227-36.
- KIBENGE, F. S., DHILLON, A. S. & RUSSELL, R. G. 1988. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol*, 69 (Pt 8), 1757-75.
- KUTATELADZE, T. G. 2010. Translation of the phosphoinositide code by PI effectors. *Nat Chem Biol*, 6, 507-13.
- LAWTON, J. A., ESTES, M. K. & PRASAD, B. V. 2000. Mechanism of genome transcription in segmented dsRNA viruses. *Adv Virus Res*, 55, 185-229.
- LEE, C. C., WU, C. C. & LIN, T. L. 2014. Chicken melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) recognizes infectious bursal disease virus infection and triggers MDA5-related innate immunity. *Arch Virol*, 159, 1671-86.
- LEMON, S. M. 1985. Type A viral hepatitis. New developments in an old disease. *N Engl J Med*, 313, 1059-67.
- LI, S. S. 2005. Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem J*, 390, 641-53.
- LI, Z., WANG, Y., XUE, Y., LI, X., CAO, H. & ZHENG, S. J. 2012. Critical role for voltage-dependent anion channel 2 in infectious bursal disease virus-induced apoptosis in host cells via interaction with VP5. *J Virol*, 86, 1328-38.
- LIN, T. W., LO, C. W., LAI, S. Y., FAN, R. J., LO, C. J., CHOU, Y. M., THIRUVENGADAM, R., WANG, A. H. & WANG, M. Y. 2007. Chicken heat shock protein 90 is a component of the putative cellular receptor complex of infectious bursal disease virus. *J Virol*, 81, 8730-41.
- LIN, W., ZHANG, Z., XU, Z., WANG, B., LI, X., CAO, H., WANG, Y. & ZHENG, S. J. 2015. The association of receptor of activated protein kinase C 1(RACK1) with infectious bursal disease virus viral protein VP5 and voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2) inhibits apoptosis and enhances viral replication. *J Biol Chem*, 290, 8500-10.
- LIU, M. & VAKHARIA, V. N. 2006. Nonstructural protein of infectious bursal disease virus inhibits apoptosis at the early stage of virus infection. *J Virol*, 80, 3369-77.
- LOMBARDO, E., MARAVER, A., ESPINOSA, I., FERNANDEZ-ARIAS, A. & RODRIGUEZ, J. F. 2000. VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology*, 277, 345-57.
- LORIZATE, M. & KRAUSSLICH, H. G. 2011. Role of lipids in virus replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3, a004820.

- LUQUE, D., RIVAS, G., ALFONSO, C., CARRASCOSA, J. L., RODRIGUEZ, J. F. & CASTON, J. R. 2009a. Infectious bursal disease virus is an icosahedral polypliod dsRNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 2148-52.
- LUQUE, D., SAUGAR, I., REJAS, M. T., CARRASCOSA, J. L., RODRIGUEZ, J. F. & CASTON, J. R. 2009b. Infectious Bursal disease virus: ribonucleoprotein complexes of a double-stranded RNA virus. *J Mol Biol*, 386, 891-901.
- LWOFF, A., DULBECCO, R., VOGT, M. & LWOFF, M. 1955. Kinetics of the release of poliomyelitis virus from single cells. *Virology*, 1, 128-139.
- MATHEWS, C. K., VAN HOLDE, K. E. K. E. & AHERN, K. G. 2000. *Biochemistry*, Addison-Wesley.
- MAW, M. T., YAMAGUCHI, T., OHYA, K. & FUKUSHI, H. 2008. Detection of vaccine-like infectious bursal disease (IBD) virus in IBD vaccine-free chickens in Japan. *J Vet Med Sci*, 70, 833-5.
- MERTENS, P. P., JAMIESON, P. B. & DOBOS, P. 1982. In vitro RNA synthesis by infectious pancreatic necrosis virus-associated RNA polymerase. *J Gen Virol*, 59, 47-56.
- MOSS, S. E. 2012. How actin gets the PIP. *Sci Signal*, 5, pe7.
- MUELLER-ROEBER, B. & PICAL, C. 2002. Inositol phospholipid metabolism in Arabidopsis. Characterized and putative isoforms of inositol phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C. *Plant Physiol*, 130, 22-46.
- MUKHOPADHYAY, S., PANDA, P. K., SINHA, N., DAS, D. N. & BHUTIA, S. K. 2014. Autophagy and apoptosis: where do they meet? *Apoptosis*, 19, 555-566.
- MÜLLER, H., MUNDT, E., ETERRADOSSI, N. & ISLAM, M. R. 2012. Current status of vaccines against infectious bursal disease. *Avian Pathology*, 41, 133-139.
- MUNDT, E., BEYER, J. & MULLER, H. 1995. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. *J Gen Virol*, 76 (Pt 2), 437-43.
- MUNDT, E., KOLLNER, B. & KRETZSCHMAR, D. 1997. VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture. *J Virol*, 71, 5647-51.
- NIEVA, J. L., MADAN, V. & CARRASCO, L. 2012. Viroporins: structure and biological functions. *Nat Rev Microbiol*, 10, 563-74.
- PALOHEIMO, O., IHALAINEN, T. O., TAURIAINEN, S., VALILEHTO, O., KIRJAVAINEN, S., NISKANEN, E. A., LAAKKONEN, J. P., HYOTY, H. & VIHINEN-RANTA, M. 2011. Cocksackievirus B3-induced cellular protrusions: structural characteristics and functional competence. *J Virol*, 85, 6714-24.
- PARZYCH, K. R. & KLIONSKY, D. J. 2014. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*, 20, 460-73.
- PAYRASTRE, B., GAITS-IACOVONI, F., SANSONETTI, P. & TRONCHERE, H. 2012. Phosphoinositides and cellular pathogens. *Subcell Biochem*, 59, 363-88.
- QI, X., GAO, H., GAO, Y., QIN, L., WANG, Y., GAO, L. & WANG, X. 2009. Naturally occurring mutations at residues 253 and 284 in VP2 contribute to the cell tropism and virulence of very virulent infectious bursal disease virus. *Antiviral Res*, 84, 225-33.
- QI, X., ZHANG, L., CHEN, Y., GAO, L., WU, G., QIN, L., WANG, Y., REN, X., GAO, Y., GAO, H. & WANG, X. 2013. Mutations of residues 249 and 256 in VP2 are involved in the replication and virulence of infectious Bursal disease virus. *PLoS One*, 8, e70982.
- QIN, L., QI, X., GAO, H., GAO, Y., BU, Z. & WANG, X. 2009. Exchange of the VP5 of infectious bursal disease virus in a serotype I strain with that of a serotype II strain reduced the viral replication and cytotoxicity. *J Microbiol*, 47, 344-50.
- QIN, L., QI, X., GAO, Y., GAO, H., LU, X., WANG, Y., BU, Z. & WANG, X. 2010. VP5-deficient mutant virus induced protection against challenge with very virulent infectious bursal disease virus of chickens. *Vaccine*, 28, 3735-40.

- RANCUREL, C., KHOSRAVI, M., DUNKER, A. K., ROMERO, P. R. & KARLIN, D. 2009. Overlapping genes produce proteins with unusual sequence properties and offer insight into de novo protein creation. *J Virol*, 83, 10719-36.
- RAUF, A., VLASOVA, A., MURGIA, M., JUNG, K. & SAIF, Y. 2013. Transition from acute to persistent infection: Antigen persistence and cytotoxic T cells response in infectious bursal disease virus infected SPF chickens (P6129). *The Journal of Immunology*, 190, 173.18.
- REN, J., WEN, L., GAO, X., JIN, C., XUE, Y. & YAO, X. 2008. CSS-Palm 2.0: an updated software for palmitoylation sites prediction. *Protein Eng Des Sel*, 21, 639-44.
- RODENBERG, J., SHARMA, J. M., BELZER, S. W., NORDGREN, R. M. & NAQI, S. 1994. Flow cytometric analysis of B cell and T cell subpopulations in specific-pathogen-free chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian Dis*, 38, 16-21.
- ROUSSARIE, J. P., RUFFIE, C., EDGAR, J. M., GRIFFITHS, I. & BRAHIC, M. 2007. Axon myelin transfer of a non-enveloped virus. *PLoS One*, 2, e1331.
- SANCHEZ, A. B. & RODRIGUEZ, J. F. 1999. Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology*, 262, 190-9.
- SAUGAR, I., LUQUE, D., ONA, A., RODRIGUEZ, J. F., CARRASCOSA, J. L., TRUS, B. L. & CASTON, J. R. 2005. Structural polymorphism of the major capsid protein of a double-stranded RNA virus: an amphipathic alpha helix as a molecular switch. *Structure*, 13, 1007-17.
- SCHRODER, A., VAN LOON, A. A., GOOVAERTS, D., TEIFKE, J. P. & MUNDT, E. 2001. VP5 and the N terminus of VP2 are not responsible for the different pathotype of serotype I and II infectious bursal disease virus. *J Gen Virol*, 82, 159-69.
- SCHROEDER, A., MUELLER, O., STOCKER, S., SALOWSKY, R., LEIBER, M., GASSMANN, M., LIGHTFOOT, S., MENZEL, W., GRANZOW, M. & RAGG, T. 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*, 7, 3.
- SHIN, Y. K., LI, Y., LIU, Q., ANDERSON, D. H., BABIUK, L. A. & ZHOU, Y. 2007. SH3 binding motif 1 in influenza A virus NS1 protein is essential for PI3K/Akt signaling pathway activation. *J Virol*, 81, 12730-9.
- SPIES, U., MULLER, H. & BECHT, H. 1989. Nucleotide sequence of infectious bursal disease virus genome segment A delineates two major open reading frames. *Nucleic Acids Res*, 17, 7982.
- STENMARK, H. & AASLAND, R. 1999. FYVE-finger proteins--effectors of an inositol lipid. *J Cell Sci*, 112 (Pt 23), 4175-83.
- SULE, A. G., UMOH, J. U., ABDU, P. A., AJOGI, J., JIBRIN, U. M., TIJJANI, A. O., ATSNDA, N. N. & GIDADO, A. S. 2013. A serological survey for infectious bursal disease virus antibodies among village chickens in Yobe State Nigeria. *International Journal of Agricultural Sciences*, 3, 596-598.
- SWAI, E. S., KESSY, M. J., SANKA, P. N. & MTUI, P. F. 2011. A serological survey for infectious bursal disease virus antibodies in free-range village chickens in northern Tanzania. *J S Afr Vet Assoc*, 82, 32-5.
- TACKEN, M. G., THOMAS, A. A., PEETERS, B. P., ROTTIER, P. J. & BOOT, H. J. 2004. VP1, the RNA-dependent RNA polymerase and genome-linked protein of infectious bursal disease virus, interacts with the carboxy-terminal domain of translational eukaryotic initiation factor 4AII. *Arch Virol*, 149, 2245-60.
- TACKEN, M. G., VAN DEN BEUKEN, P. A., PEETERS, B. P., THOMAS, A. A., ROTTIER, P. J. & BOOT, H. J. 2003. Homotypic interactions of the infectious bursal disease virus proteins VP3, pVP2, VP4, and VP5: mapping of the interacting domains. *Virology*, 312, 306-19.
- TAKAHASHI, T. & SUZUKI, T. 2011. Function of membrane rafts in viral lifecycles and host cellular response. *Biochem Res Int*, 2011, 245090.

- TUSNADY, G. E. & SIMON, I. 2001. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics*, 17, 849-50.
- VAKHARIA, V. N., HE, J., AHAMED, B. & SNYDER, D. B. 1994. Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. *Virus Res*, 31, 265-73.
- VALLI, A., BUSNADIEGO, I., MALIOGKA, V., FERRERO, D., CASTON, J. R., RODRIGUEZ, J. F. & GARCIA, J. A. 2012. The VP3 factor from viruses of Birnaviridae family suppresses RNA silencing by binding both long and small RNA duplexes. *PLoS One*, 7, e45957.
- VAN DEN BERG, T. P., ETERRADOSSI, N., TOQUIN, D. & MEULEMANS, G. 2000. Infectious bursal disease (Gumboro disease). *Rev Sci Tech*, 19, 509-43.
- VAN MEER, G., VOELKER, D. R. & FEIGENSON, G. W. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 112-124.
- VIKLUND, H., BERNSEL, A., SKWARK, M. & ELOFSSON, A. 2008. SPOCTOPUS: a combined predictor of signal peptides and membrane protein topology. *Bioinformatics*, 24, 2928-9.
- VON EINEM, U. I., GORBALENYA, A. E., SCHIRRMIEIER, H., BEHRENS, S. E., LETZEL, T. & MUNDT, E. 2004. VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol*, 85, 2221-9.
- WANG, X., ZHANG, H., GAO, H., FU, C., GAO, Y. & JU, Y. 2007. Changes in VP3 and VP5 genes during the attenuation of the very virulent infectious bursal disease virus strain Gx isolated in China. *Virus Genes*, 34, 67-73.
- WANG, X. M., ZENG, X. W., GAO, H. L., FU, C. Y. & WEI, P. 2004. Changes in VP2 gene during the attenuation of very virulent infectious bursal disease virus strain Gx isolated in China. *Avian Dis*, 48, 77-83.
- WARD, G. A., STOVER, C. K., MOSS, B. & FUERST, T. R. 1995. Stringent chemical and thermal regulation of recombinant gene expression by vaccinia virus vectors in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 6773-7.
- WEI, L., HOU, L., ZHU, S., WANG, J., ZHOU, J. & LIU, J. 2011. Infectious bursal disease virus activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway by interaction of VP5 protein with the p85alpha subunit of PI3K. *Virology*, 417, 211-20.
- WU, Y., HONG, L., YE, J., HUANG, Z. & ZHOU, J. 2009. The VP5 protein of infectious bursal disease virus promotes virion release from infected cells and is not involved in cell death. *Arch Virol*, 154, 1873-82.
- XUE, Y., REN, J., GAO, X., JIN, C., WEN, L. & YAO, X. 2008. GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Mol Cell Proteomics*, 7, 1598-608.
- YAO, K., GOODWIN, M. A. & VAKHARIA, V. N. 1998. Generation of a mutant infectious bursal disease virus that does not cause bursal lesions. *J Virol*, 72, 2647-54.
- YE, C., JIA, L., SUN, Y., HU, B., WANG, L., LU, X. & ZHOU, J. 2014. Inhibition of antiviral innate immunity by birnavirus VP3 protein via blockage of viral double-stranded RNA binding to the host cytoplasmic RNA detector MDA5. *J Virol*, 88, 11154-65.
- YE, C., WANG, Y., ZHANG, E., HAN, X., YU, Z. & LIU, H. 2017. VP1 and VP3 are required and sufficient for translation initiation of uncapped IBDV genomic dsRNA. *J Virol*.
- YIP, C. W., HON, C. C., ZENG, F. & LEUNG, F. C. 2012. Cell culture-adapted IBDV uses endocytosis for entry in DF-1 chicken embryonic fibroblasts. *Virus Res*, 165, 9-16.